

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE FARMACOLOGÍA,
BROMATOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA**

**“ESTUDIO FARMACOGNOSTICO Y
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
ANTITUBERCULOSA DE *Spergularia media*
(L.) Griseb. CHOQUETACARPO”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Miguel Angel Machaca Cañasaire

Rosario Luis Ayala

ASESOR

Bertha Jurado Teixeria

Lima – Perú

2007

DEDICATORIA

A mi querido padre Edilberto

Que con mucho cariño y gran sacrificio ha hecho
posible la culminación de mis ideales;
sea esta mi ofrenda al profundo cariño
que le profeso...
“A él mi eterno agradecimiento”

A mi querida madre Celia

Que con su amor y abnegación me prodigó
valiosos consejos y logró conducirme
con optimismo a la cristalización
de mi más grande anhelo...
“A ella mi profunda admiración”

A mis queridos hermanos:

Rosa, Omar y Alexis
fuente inagotable de alegría y aliento en mi vida
y para quienes deseo ser siempre
con la ayuda de Dios, un gran ejemplo a seguir...
“A ellos mi profundo cariño”

A mi compañero de tesis

Miguel Angel, quien con su constante apoyo
y buen carisma, me ayuda a seguir siempre adelante...
“A él mi eterno cariño”

ROSARIO

DEDICATORIA

A mi padre: Domingo

Mi eterna gratitud, quien me sirve de modelo y guía,
me inculcó valores necesarios para ser un buen profesional,
por ti padre obraré correctamente sin desviarme...porque sigo tu ejemplo.

A mi madre: Isabel

Símbolo de amor maternal, gracias a ella estoy alcanzando mis metas,
a pesar de los obstáculos que encontramos en nuestro camino,
ella siempre estuvo allí dándome su apoyo y cariño.
Esto solo es el principio y seguiré triunfando.....porque tú me lo enseñaste.

A mis hermanos: Nestor, Carlos, Julia, Ana y Reyna.

A ellos siempre los tengo presente, ya que estuvieron conmigo siempre,
dándome su apoyo y amor fraternal...a todos ellos les deseo lo mejor siempre.

A mi compañera de tesis: Rosario

Por ser tan buena amiga y consejera, pasamos juntos buenos y malos momentos,
y espero que esta amistad dure para toda la vida.
Querida amiga no sabes cuanto te quiero.

MIGUEL ANGEL

***“Las ciencias tienen las raíces
amargas, pero muy dulces los frutos”***

Aristóteles

(Estagira, 384 A.C. - 322 A.C.), Filósofo griego

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas quienes contribuyeron a la realización del presente trabajo. “A ellos nuestro eterna gratitud”.

A nuestra Directora de Tesis Q.F. Bertha Jurado Teixeira, nuestro más sincero agradecimiento por su entrega incondicional día a día y por las muchas horas compartidas, como maestra, consejera y amiga.

A los Docentes Dr. Manuel Fernández, Dra. Arilmi Gorriti, Mg. César Fuertes, por su guía y colaboración desinteresada en todo momento.

Al Laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud conformados por el Staff Profesional de Biología, Luis Asencios, Lucy Vásquez, Neyda Quispe, Gustavo Pariona, Tatiana Cáceres, Celer Pantoja, Mirko Díaz, a la Lic. Nancy Linares y en especial con mucho cariño a la Blga. Elena Leo y al Tec. Lino Gómez. A todos ellos por su valioso apoyo y por las facilidades otorgadas para la realización de los ensayos microbiológicos.

Al Sr. Edilberto Luis Herrera por su ayuda incondicional en la recolección de nuestra planta.

Agradecemos también sinceramente a todos nuestros compañeros que en el transcurso de esta bella carrera, nos ayudaron y acompañaron en este largo camino.

Gracias

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN

II. GENERALIDADES

INFORMACIÓN ETNOBOTÁNICA

ASPECTOS BOTÁNICOS

CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA

CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE

CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA

TUBERCULOSIS

PATOGENIA

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

DIAGNÓSTICO

PRONÓSTICO

TRATAMIENTO

SAPONINAS - SAPOGENINAS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

COLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PROBLEMA

ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO

EXTRACCIÓN ETANÓLICA

EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES

DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

OBTENCIÓN DE SAPONINAS – SAPOGENINAS

EXTRACCIÓN

DESENGRASADO-DESPIGMENTADO

HIDRÓLISIS

PURIFICACIÓN DE SAPOGENINAS CRUDAS

IDENTIFICACIÓN DE SAPOGENINAS

ENSAYOS BIOLÓGICOS

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

MÉTODO OECD 423 (OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICAL).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA

MÉTODO DE LAS PROPORCIONES DE CANETTI RIST Y GROSSET.

IV. RESULTADOS

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VII. RECOMENDACIONES

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX. ANEXOS

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó el estudio farmacognóstico y la determinación de la actividad antituberculosa de la raíz de *Spergularia media* (L.) Griseb (Choquetacarpo) nativa de la provincia de Paucartambo, departamento del Cusco utilizada por sus propiedades contra afecciones respiratorias y hemoptisis, entre otras. Al realizar la búsqueda bibliográfica se comprueba que no existe investigación científica sobre *Spergularia media* (L.) Griseb “Choquetacarpo” que evidencie sus propiedades terapéuticas, sus constituyentes químicos e inocuidad. Inicialmente se verifica la sistemática, características morfológicas e histológicas. En el Estudio Farmacognóstico se identificaron carbohidratos, alcaloides, esteroides, glicósidos y principalmente saponinas. Se realizó una extracción hidroalcohólica para saponinas, su posterior hidrólisis y se obtuvieron sapogeninas triterpénicas, las cuales fueron identificadas por reacciones de coloración específicas y Cromatografía en Capa Fina. El ensayo toxicológico se desarrolló siguiendo el método de Toxicidad Aguda oral OECD 423, según la Organización Mundial de la Salud (OMS); el cual la clasifica como especie atóxica. La evaluación del efecto antituberculoso se realizó por el método de Proporciones de Canetti, Rist y Grosset utilizando extracto etanólico, de saponinas, de sapogeninas y alcaloides; extraídos de la raíz de *Spergularia media* (L.) Griseb (Choquetacarpo). Se comprobó la actividad antituberculosa de las saponinas y sapogeninas triterpénicas, presentes en la raíz; frente a las cepas de *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV.

Palabras Clave: *Spergularia media* (L.) Griseb; Choquetacarpo; farmacognóstico; saponinas; sapogeninas triterpénicas; *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV.

SUMMARY

Presently work was carried out the study pharmacognostic, and the determination of the activity in the treatment the Tuberculosis of the root of *Spergularia media* (L.) Griseb “Choquetacarpo” native of the county of Paucartambo, department of the Cusco used by its properties against breathing affections and hemoptysis, among others. When carrying out the bibliographical search she is proven that scientific investigation doesn't exist on *Spergularia media* (L.) Griseb "Choquetacarpo" that evidences its therapeutic properties, its chemical constituents and innocuous. Initially the systematic, characteristic is verified morphological and histological. In the study pharmacognostic carbohydrates, alkaloids, steroids, glycosides and mainly saponins were identified. She was carried out an extraction it dilutes alcoholic for saponins, their later hydrolysis and sapogenins triterpenoids, was obtained, which were identified by specific reactions of coloration and Chromatographic in Fine Layer. The toxicological rehearsal you development following the method of oral Sharp Toxicity OECD 423, according to the World Organization of the Health (WHO); which classifies it as species not toxic. The evaluation of the effect in the treatment the tuberculosis was carried out for the method of Proportions of Canetti, Rist and Grosset using I summarize etanolic, of saponins, of sapogenins and alkaloids; extracted of the root of *Spergularia media* (L.) Griseb “Choquetacarpo”. She was proven the activity in the treatment the Tuberculosis of the saponins and sapogenins triterpenoids, present in the root; in front of the stumps of *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV.

Key Words: *Spergularia media* (L.) Griseb; Choquetacarpo; pharmacognostic; saponins; sapogenins triterpenoids; *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis, sigue constituyendo un problema de salud pública a nivel mundial, particularmente en los países en vías de desarrollo como el nuestro. En el Perú la morbilidad tuberculosa alcanza la tasa más alta de América. Por tal motivo el descubrimiento de medicamentos antituberculosos ha constituido una de las armas de la medicina para contribuir al control de esta enfermedad, sin embargo, la resistencia a estos medicamentos, agravado con el aumento de los pacientes infectados por el VIH quienes son muy susceptibles de adquirir TBC, están poniendo en riesgo los logros obtenidos a través de los años mediante los programas de control, basados en esquemas de tratamiento eficaces. Este problema muestra el vacío que existe de fármacos alternativos en el país y el mundo, además de la urgencia en la investigación de nuevas drogas antituberculosas. Por otro lado el Perú por sus condiciones climáticas y geográficas posee una abundante y variada flora que nuestra población, especialmente en comunidades nativas la utiliza en medicina tradicional. Sin embargo la mayoría de plantas medicinales no poseen estudios científicos que sustenten su uso como fitomedicamento. ^(1, 2)

Investigaciones realizadas con Choquetacarpo; por la Dra. Amelia Maldonado y el Dr. Paolo Iacarino, refieren que seleccionaron pacientes con baciloscopía positiva, se les trato con cocimiento de la raíz, por un periodo de cinco meses con evolución favorable; en el primer mes de tratamiento, observaron sudoración y aumento de la expectoración; al segundo mes, en las imágenes radiológicas se observaron que las cavernas tuberculosas, característico de la enfermedad, habían disminuido en más del 60%. ⁽³⁾. Por lo expuesto, el presente trabajo de investigación plantea un estudio científico y racional de las raíces de *Spergularia media* (L.) Griseb “Choquetacarpo” como alternativa terapéutica en el tratamiento de la tuberculosis, sobre todo por su condición natural, fácil manejo y bajo costo, mejorando así la calidad de vida de las personas afectadas. ⁽⁴⁾

II. GENERALIDADES

2.1 INFORMACIÓN ETNOBOTÁNICA

Choquetacarpo es un vocablo quechua nativo de la región andina del Cusco, que significa “barreta de oro” y que corresponde en este caso a *Spergularia media* (L.) Griseb., una planta herbácea perteneciente a la familia Cariofiláceae, oriunda de la provincia de Paucartambo departamento de Cusco, silvestre en las comunidades pequeñas de Ninanmarca, Mashuay y Colquepata, situados a más de 3400 m.s.n.m. (Fotografía N°1).⁽³⁾

La provincia de Paucartambo se ubica en la parte central y al este del departamento del Cuzco, sobre territorios de la cordillera Oriental y Ultraoriental de la región andina sur. El suelo donde crece Choquetacarpo se caracteriza por ser rocoso, con tierra arcillosa y pedregoso llamadas “collpas”. Se utiliza en Medicina Tradicional en la cura de ciertas enfermedades como bronquitis, tisis pulmonar y otras afecciones respiratorias, también en raquitismo, nicturia y diarreas. El uso popular refiere el cocimiento de 20g de raíces secas en un litro de agua, que se administra como agua de tiempo, tres veces al día, para tratar problemas de bronquitis, tisis pulmonar y otras afecciones respiratorias. A su vez Choquetacarpo en su forma silvestre se utiliza como alimento importante para el ganado vacuno y ovino de la región.⁽³⁾



Fotografía N°1. Comunidad de Ninanmarca, lugar de colecta (Cusco).

2.2 ASPECTOS BOTÁNICOS

2.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA CARIOFILACEAE

La familia Cariofilaceae abarca alrededor de 88 géneros, con una gran variedad de especies, cerca de 2000, que se desarrollan principalmente en zonas templadas del hemisferio norte y sur. Son plantas generalmente de tipo herbáceo, raramente arbustos o sub-arbustos. Crecen en un hábitat muy variado, propias de matorrales, de campos de cultivo abandonados y en uso, márgenes de caminos y carreteras, rocas costeras, dunas, etc. Las hojas son opuestas (algunas especies presentan hojas alternas) simples, enteras, usualmente son estrechas y suelen estar conectadas por una línea transversal en la base. Pueden tener o no estípulas. Los tallos suelen presentar nudos engrosados que ocasionalmente, tienen crecimiento secundario anómalo. Las inflorescencias son de tipo cimosas, solitarias. Suelen ser regulares, hermafroditas, rara vez unisexuales. Pueden ser pentámeras o más raramente, tetrámeras; de sépalos libres o casi libres, pueden estar soldados formando un tubo con un anillo nectarífero en el interior; los pétalos pueden estar presentes o ausentes, con presentación de 5 a 10 estambres en 1 o 2 ciclos. El gineceo consta de 2-5 carpelos, con estilos más o menos soldados. Ovario súpero, unilocular por arriba y más o menos dividido hacia la base, suele presentar una columna placentaria, generalmente continua. Suelen tener numerosos primordios seminales. El fruto suele ser una cápsula dehiscente por tantas valvas (o el doble) que estilos, también puede ser utricular y entonces suele encerrar el cáliz o el hipanto. Algunas especies tienen el fruto en baya.

Las semillas suelen estar ornamentadas.^(5, 6, 7, 8)

2.2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE

La especie se distribuye a nivel mundial, en climas templados, tanto en Europa y Asia, América del Norte, Centro y Sur. En el Perú se encuentra en el departamento del Cuzco a una altitud de más de 3400 m.s.n.m. Es una planta herbácea, crece junto con las denominadas “mala hierbas” maduran entre los meses de enero, febrero, marzo y abril, que son la época de colecta apropiada, ya que luego de esta época las hojas y flores caen y no se le puede ubicar. Hierba perenne, mas o menos glandular pubescente, especialmente en la parte apical de las ramas; tallos postrados o ascendentes, con nudos prominentes, algunas veces de varios centímetros de longitud; hojas linear-filiforme a tubulados de 1-3 mm de longitud; flores blancas (Fotografía N°2), los pedicelos delgados frecuentemente elongados o a veces reflexos; cáliz de 4-4.5 mm

excepcionalmente hasta 6 mm de longitud casi del mismo tamaño de los pétalos blancos con los ápice algo purpúreos.⁽⁸⁾

La muestra vegetal en estudio fue clasificada en el Museo de Historia natural, por el biólogo Hamilton W. Beltran, acorde al Sistema de Clasificación de A. Cronquis et al 1981⁽⁹⁾, como sigue:

División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Caryophyllidae
Orden: Caryophyllales
Familia: Caryophyllaceae
Género: *Spergularia*
Especie: *Spergularia media* (L.)
Griseb.



Fotografía N°2. Especie madura en florecimiento, apta para su colecta.

2.3 TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa producida por el *Micobacterium tuberculosis* (bacilo de Koch), responsable de variados cuadros clínicos, pulmonares y extrapulmonares (Figura N°1), que incluyen manifestaciones generales y locales. A pesar de ser una enfermedad bien conocida y curable, aún no ha logrado ser erradicada, dado que está asociada a factores de riesgo vigentes como son la pobreza, el subdesarrollo y la pandemia VIH/SIDA. ^(10, 11, 12, 13)

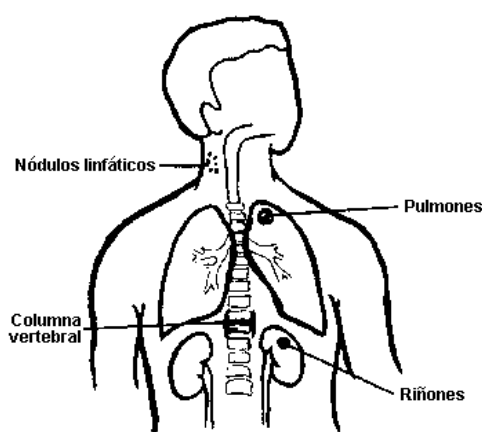


Figura N°1. Tuberculosis pulmonar y extrapulmonar.

El *Micobacterium tuberculosis* infecta al 33% de la población mundial, las defunciones por tuberculosis representan el 25% de toda la mortalidad. A partir de 1993 se generó una gran preocupación en la OMS por la nueva epidemia de TBC, al punto de declararla una emergencia mundial.

En el Perú, el año 1991 el Ministerio de Salud (MINSA) implementó la Terapia Directamente Observada de Corta Duración (DOTS), que es la estrategia recomendada por la OMS para el control de la Tuberculosis de acuerdo a los estudios de costo efectividad realizados.

Durante el año 2005, la tasa de morbilidad ha sido de 129.02 x 100,000 hab., de ellos 18,490 personas enfermas corresponden a casos con Tuberculosis pulmonar frotis positivo (TBP-FP) nunca tratados, lo que determina una tasa de incidencia de 67.12 x 100,000 hab. Del total de casos diagnosticado en el año 2005, el 58.7% corresponde a las Direcciones de Salud de Lima y Callao, y las Direcciones de Salud del interior del país: La Libertad, Loreto, Arequipa, Ica y Junín, son las que reportan el mayor número de casos. ^(1, 2)

2.3.1 PATOGENIA

El contagio es por vía aerógena a partir de pacientes BK (+) con lesiones pulmonares «abiertas», es decir, conectadas con el exterior por un bronquio de drenaje. Al toser generan aerosoles de pequeñas partículas líquidas (gotas de Flügge) (Figura N°2), en cuyo interior se encierran 1 o 2 bacilos. Al evaporarse queda el núcleo de bacilos, que permanece en el medio ambiente y se desplaza con las corrientes de aire, pudiendo ser aspirado por otras personas.

Las partículas de tamaño superior a 10 mm, quedan retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar, pero las de menor tamaño (entre 1-5 mm) tienen la capacidad de llegar hasta los alvéolos y desencadenar la primoinfección.

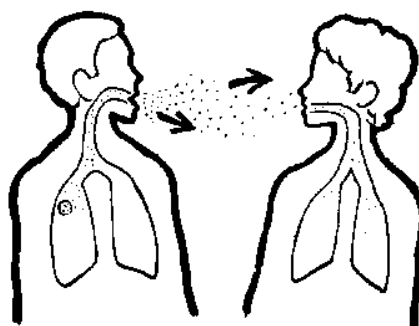


Figura N°2. Contagio por vía aerógena (gotas de Flügge).

En la **tuberculosis primaria**, la aspiración de *Micobacterium tuberculosis* hasta los alvéolos desencadena una serie de respuestas tisulares e inmunológicas:

Entre las 2 y 10 semanas posteriores a la infección se desarrolla una respuesta inmunológica celular desencadenada por los antígenos de la membrana y del citoplasma de las micobacterias (Figura N°3). Los macrófagos, que reconocen y procesan dichos antígenos y los muestran a los linfocitos T para que estimulen, mediante liberación de linfocinas, la transformación de un gran número de macrófagos en células que están altamente especializadas en la lucha contra las micobacterias (células epitelioides y gigantes de Langhans), así da lugar al característico granuloma tuberculoso, que al cabo de un tiempo se reblandece en su centro y deja un núcleo de necrosis caseosa.

En muchos casos este sistema defensivo controla totalmente la infección y una vez cumplido su cometido se reabsorbe, dejando tan sólo una pequeña cicatriz fibrosa que para mayor seguridad acostumbra a calcificarse. En estas circunstancias, es posible que la primoinfección haya sido asintomática, y que incluso no deje secuelas detectables en la radiografía de tórax; lo que sí queda es la memoria inmunológica, que se pondrá de manifiesto con la prueba de la tuberculina

y permitirá diferenciar los individuos infectados (tuberculina-positivos) de los no infectados (tuberculina-negativos).

La tuberculosis posprimaria, también denominada secundaria, es la forma clínico-radiográfica más frecuente, aunque en general el individuo no tiene constancia de la primoinfección previa por haber sido ésta asintomática o poco aparente.

En algunos casos se debe a una reinfección exógena, pese al relativo grado de inmunidad del sujeto infectado. No obstante, lo más común es la reinfección endógena, por micobacterias latentes capaces de resistir ocultas en el interior de algunas células o en pequeños focos caseosos en condiciones metabólicas adversas, en un continuo equilibrio con las defensas orgánicas, que se rompe tras muchos años por alteraciones, transitorias o persistentes, de la inmunidad. ^(10, 11, 12, 13)

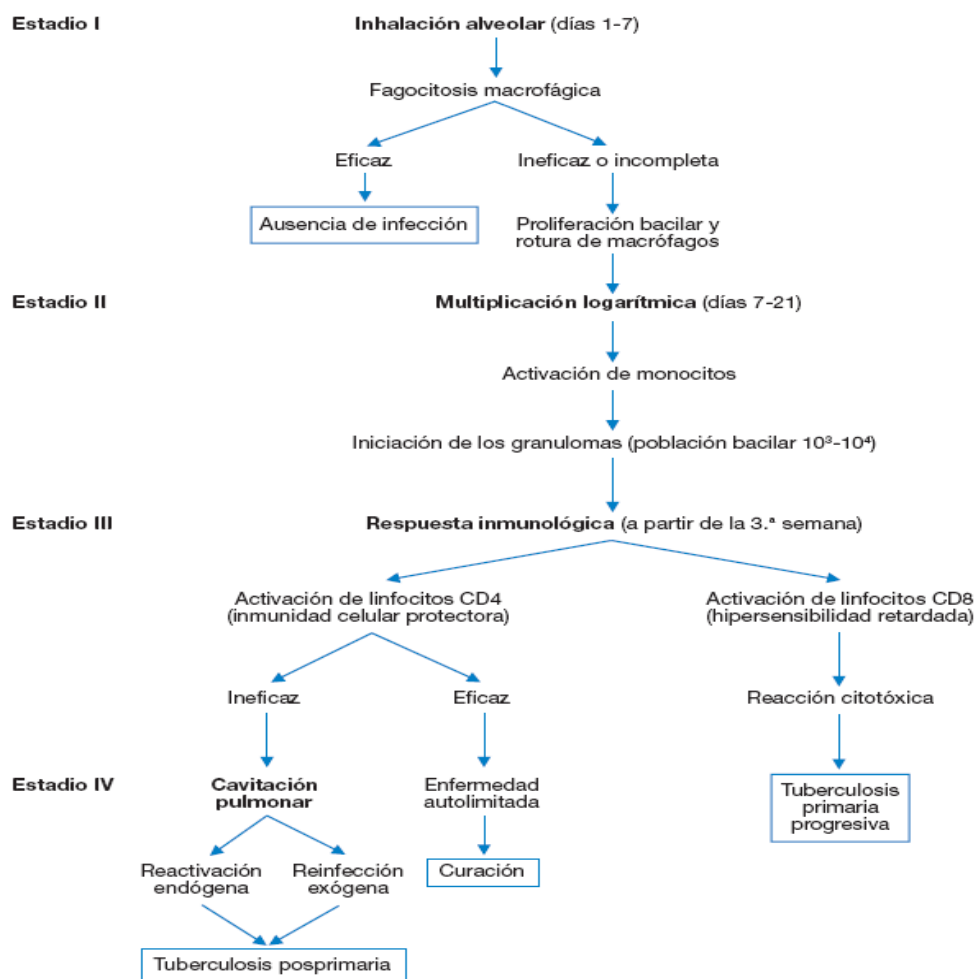


Figura N°3. Patogenia de la tuberculosis
(Fuente: J. Rodas T. Medicina Interna . 1997. Tomo I.)

2.3.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

A menudo la tuberculosis primaria es asintomática o se presenta con síntomas leves e inespecíficos (tos, febrícula), como cualquier infección respiratoria banal. En otras el cuadro clínico es más alarmante: anorexia, pérdida de peso, fiebre alta, hemoptisis, eritema nudoso, afectación extrapulmonar, y el diagnóstico es más fácil, aunque un porcentaje elevado de primoinfecciones pasan inadvertidas y sólo se descubren a posteriori ante la positividad de la prueba de la tuberculina. La radiografía de tórax muestra, en los casos típicos, la denominada imagen bipolar: hipertrofia de los ganglios linfáticos y foco de alveolitos pulmonares que se manifiesta como una opacidad homogénea de 1-10 cm. de diámetro localizada preferentemente en los lóbulos superiores, aunque también puede situarse en otras zonas. ^(10, 11, 13)

Cuando la enfermedad sigue un curso progresivo presenta varias posibilidades evolutivas:

- 1. *Tuberculosis primaria progresiva.*** Aparecen infiltrados pulmonares bilaterales, cavitación y diseminaciones.
- 2. *Diseminación broncógena.*** Se produce por la abertura de un foco caseoso en el árbol bronquial, con la consiguiente propagación multifocal y bilateral (Figura N°4).
- 3. *Diseminación hematógena.*** Aparece cuando el paso de algunos bacilos al torrente circulatorio (un hecho habitual y generalmente asintomático) lleva a una diseminación masiva; las micobacterias invaden otros órganos (meninges, hígado, riñón, peritoneo, sistema osteoarticular) o el mismo pulmón, produciendo síntomas secundarios a estas localizaciones. La pleura también puede afectarse (pleuresía tuberculosa) por diseminación hematógena o por afectación directa por un foco pulmonar subpleural.
- 4. *Tuberculosis bronquial.*** Está causada por la compresión y la fistulización de las adenopatías (bronquitis tuberculosa).
- 5. *Complicaciones tardías.*** Se debe a la cicatrización de las lesiones bronquiales y de las adenitis, que ocasionan broncoestenosis, bronquiectasias localizadas, atelectasias crónicas (síndrome del lóbulo medio) y divertículos del tercio medio del esófago (divertículos por tracción). En tales casos, aunque la tuberculosis haya curado, persistirán síntomas relacionados con dichas complicaciones.
- 6. *Tuberculosis posprimaria.*** Suele tener un inicio solapado, con tos productiva, inapetencia, sudación nocturna y cansancio, pudiendo pasar meses hasta que se realice el diagnóstico etiológico, e incluso suceder que los síntomas sean mínimos y que se descubra la enfermedad con motivo de un examen radiográfico preoperatorio o de control. En otras ocasiones el comienzo es agudo, con fiebre alta o hemoptisis. En estos casos el diagnóstico es precoz, pero no existe una exacta correlación entre la extensión anatómica de las lesiones y la aparatosidad de los síntomas.

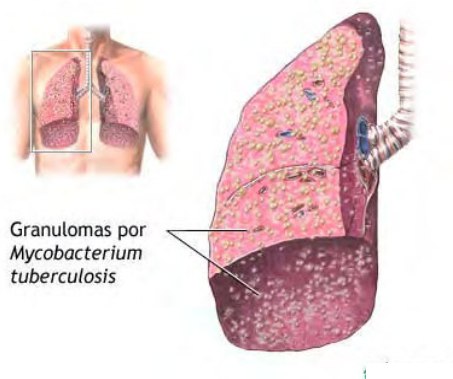


Figura N°4. Propagación multifocal y bilateral en la Tuberculosis pulmonar.

2.3.3 DIAGNÓSTICO

Prueba de la tuberculina. La tuberculina es un extracto de cultivos líquidos de *Micobacterium tuberculosis*, con esta prueba se manifiesta la hipersensibilidad retardada, que traduce la respuesta inmunitaria del organismo frente a los extractos proteicos del bacilo de Koch. Por lo tanto, un resultado positivo indica que existe infección, pero no siempre es sinónimo de enfermedad. Por el contrario, un resultado negativo, una vez excluidas las causas de falsos negativos, indica que el individuo no ha sido infectado. La inyección ha de ser estrictamente intradérmica, ya que si es más profunda no podrá realizarse la lectura, que se efectúa a las 48 o 72 horas, midiendo con regla transparente la zona de induración. Se da como positiva una induración a partir de 15 mm.

Estudio microbiológico. Consiste en la identificación de las micobacterias en el esputo o en otros productos orgánicos (jugo gástrico, broncoaspirados selectivos obtenidos por fibroscopía, biopsias) como requisito imprescindible para confirmar el diagnóstico de sospecha de tuberculosis activa (Figura N°5).

La técnica clásica de identificación es el examen microscópico directo del esputo, fijado y teñido por el método de Ziehl-Neelsen, basado en la resistencia a los ácidos y al alcohol de las micobacterias, o por el método de fluorescencia. Para que el frotis sea positivo en el examen directo, es decir, muestre la presencia de los gérmenes, es preciso que el esputo contenga como mínimo 10.000 Bacilos Ácido-Alcohol-Resistentes (BAAR)/mL. Esta baja sensibilidad requiere que el estudio siempre se complete con el cultivo en medio sólido de Löwenstein-Jensen, o con alguna de sus variantes (Middelbrook, Dubos). El cultivo sólo necesita de 10 BAAR/ml para ser considerado positivo y además permite la identificación de las diferentes especies de

micobacterias, así como el estudio de resistencia *in vitro* a fármacos antituberculosos. El mayor inconveniente estriba en que se necesitan entre 4 y 8 semanas para comprobar el crecimiento de las colonias. Este problema se ha solucionado en parte gracias a los cultivos radiométricos (sistema BACTEC), que sólo precisan de 8 a 15 días.

Para aumentar el rendimiento diagnóstico se deben recoger 3 muestras de esputo en días sucesivos. Con la combinación de examen directo y cultivo en esputos seriados, se consigue el diagnóstico de certeza en el 90 % de todas las tuberculosis pulmonares activas. Cuando el paciente no expectora, se intenta obtener el esputo mediante palmoteo del tórax o por inhalación de aerosol con suero fisiológico (esputo inducido). Si pese a estas maniobras no se consigue una muestra válida, las técnicas de elección son la fibrobroncoscopia, que permite practicar broncoaspirados selectivos, líquido bronco alveolar (LBA) y la biopsia (si existen lesiones bronquiales), siendo de mayor rentabilidad diagnóstica que el aspirado gástrico en ayunas.^(11, 13)

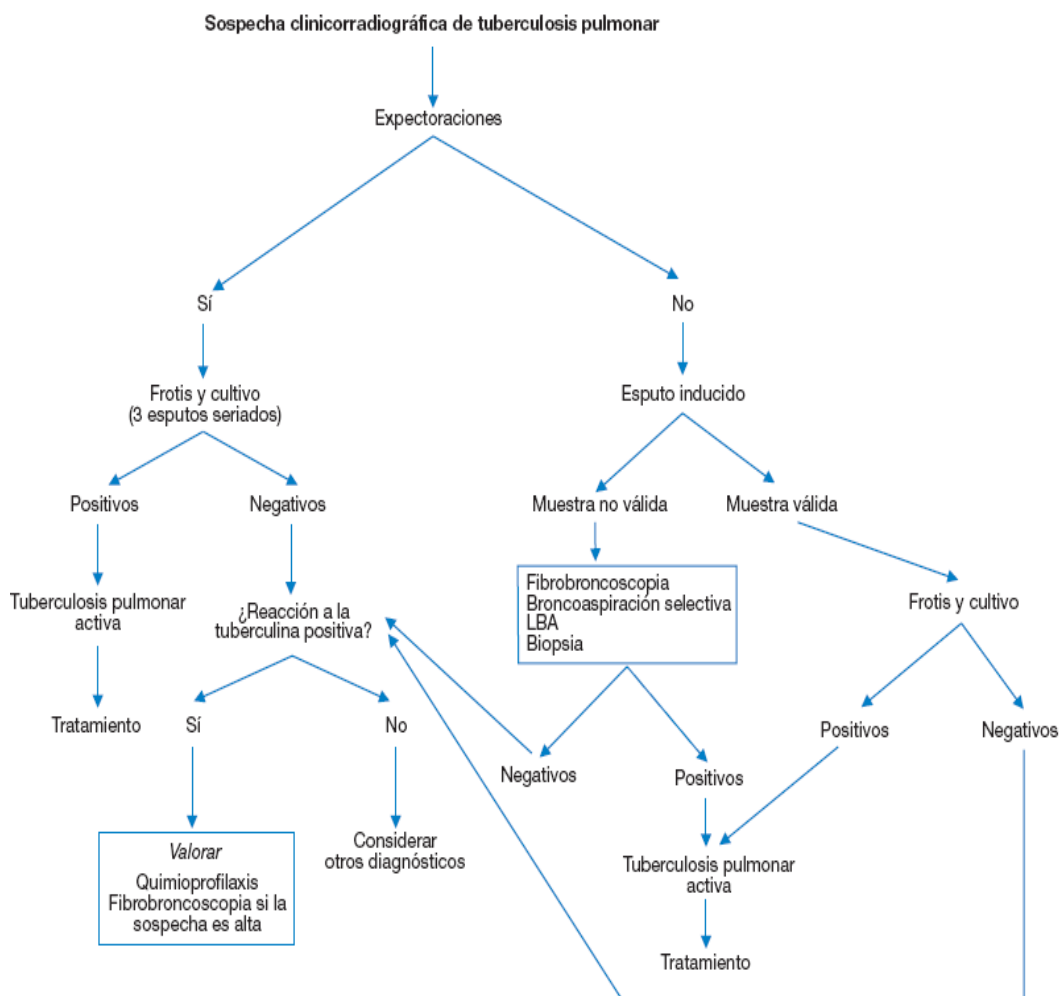


Figura N°5. Conducta ante un diagnóstico de sospecha de tuberculosis pulmonar activa.
(Fuente: J. Rodas T. Medicina Interna . 1997. Tomo I.)

2.3.4 PRONÓSTICO

Hace poco más de 50 años la tuberculosis era una de las enfermedades con un mayor porcentaje de mortalidad, ya que no se disponía de un tratamiento eficaz. En la actualidad, gracias a la moderna quimioterapia, es posible asegurar la curación en prácticamente el 100 % de los casos, con esquemas terapéuticos de fácil administración, bien tolerados y con escasas complicaciones. Incluso en las formas más graves (tuberculosis miliares, tuberculosis asociadas al SIDA), esta afirmación sigue siendo válida a condición de que el diagnóstico sea precoz, la pauta correcta y el cumplimiento estricto por parte del paciente.

El mayor problema se presenta por los abandonos del tratamiento (drogadictos, personas asociales o con incorrecta información médica), que convierten una enfermedad potencialmente curable en un importante peligro social, por el riesgo de crear multirresistencia a los medicamentos más eficaces. ^(11, 13)

2.3.5 TRATAMIENTO

En la tuberculosis es necesario establecer una pauta que asocie varios fármacos durante meses para conseguir el efecto deseado (Figura N°6). Si se administra un único medicamento, por muy eficaz que sea, al cabo de poco tiempo los bacilos desarrollan resistencias bacteriológicas por mutaciones cromosómicas espontáneas (cepas mutantes resistentes).

La rifampicina y la isoniazida, por su mayor o menor efecto sobre todas las poblaciones, son la base de la quimioterapia actual de la tuberculosis, junto a la pirazinamida, dada su acción específica e intensa contra la población intracelular.

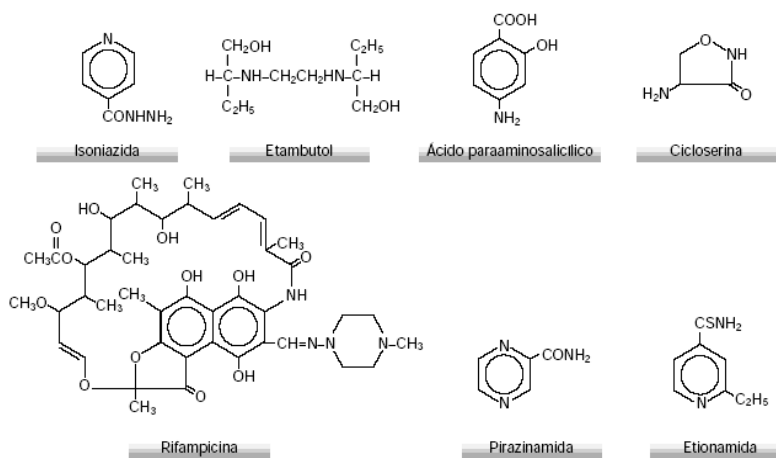


Figura N°6. Estructura de los fármacos antituberculosos.

(Fuente: J. Flores. Farmacología Humana. 3ra. Edición.1997)

Fármacos y esquemas terapéuticos. Los fármacos antituberculosos pueden clasificarse como de primera y segunda línea. Los fármacos de primera línea son los más activos y se utilizan en el tratamiento inicial de la tuberculosis. En este grupo se incluyen rifampicina, isoniazida, estreptomycin, pirazinamida y etambutol. Los de segunda línea (cicloserina, protionamida, capreomicina, entre otros) son menos activos y más tóxicos; su empleo actual queda relegado a retratamientos de tuberculosis con resistencias a los fármacos de primera línea (Tabla N°1).

También conviene diferenciar entre:

1. Fármacos bactericidas, con capacidad de destruir los bacilos en crecimiento o metabólicamente activos. Son la rifampicina, la estreptomycin, la isoniazida y el etambutol (a dosis altas).
2. Fármacos esterilizantes, con capacidad de atacar y destruir los bacilos de metabolismo lento o intermitente. En este grupo destaca la pirazinamida, por su efecto sobre la población intracelular en pH ácido, la rifampicina y la isoniazida.

Tabla N°1. Dosis Recomendada para el Tratamiento inicial de la Tuberculosis.
(Fuente: J. Rodes T. Medicina Interna . 1997. Tomo I.)

FÁRMACO	DOSIS DIARIA		DOSIS MÁXIMA	DOSIS INTERMITENTE (2 VECES/SEMANA)	DOSIS MÁXIMA
	NIÑOS	ADULTOS		NIÑOS Y ADULTOS	
Rifampicina (p.o.)	10 mg/kg	10 mg/kg	600 mg	10 mg/kg	600 mg
Isoniazida (p.o.)	10 mg/kg	5 mg/kg	300 mg	15 mg/kg	900 mg
Pirazinamida (p.o.)	25-30 mg/kg	25-30 mg/kg	2 g (1,5 niños)	50-70 mg/kg	3.500 mg
Etambutol (p.o.)	15-25 mg/kg	15-25 mg/kg	1,5 g	50 mg/kg	3.000 mg
Estreptomycin (i.m.)	15-20 mg/kg	15 mg/kg	1 g (0,75 g > 55 años)	20-25 mg/kg	1 g (0,75 g > 55 años)

Resistencia medicamentosa, causada por tratamientos incorrectos, que dan lugar a la selección de cepas bacilares mutantes resistentes a uno o más fármacos. Si el porcentaje de resistencia primaria de un país o una determinada área geográfica es superior al 5 %, es aconsejable añadir un cuarto fármaco (etambutol o estreptomycin) en la primera fase del tratamiento (2 meses rifampicina-isoniazida-pirazinamida-etambutol y 4 meses rifampicina-isoniazida).

La medicación se toma por la mañana en ayunas, a ser posible utilizando fórmulas fijas que asocien los tres fármacos (rifampicina-isoniazida-pirazinamida) o dos de ellos (rifampicina-isoniazida). ^(11, 13)

2.4 SAPONINAS – SAPOGENINAS

El término saponina deriva del latín: sapo = jabón.

Las saponinas se han usado profusamente en muchas partes del mundo por sus propiedades detergentes.

Se denomina saponina a sustancias de tipo heterósido que tienen propiedades comunes:

- Afrógenos: producen espuma persistente por bajar la tensión superficial.
- Propiedades fisiológicas comunes: a) hemólisis: producen hemólisis de los glóbulos rojos, b) son tóxicos para animales de sangre fría y c) irritantes de la mucosa nasal y faríngea.

Químicamente se dividen según la estructura de su genina en saponinas esteroidales (Figura N°7) y saponinas triterpénicas (Figura N°8). Se denomina a las geninas, sapogeninas. Ambas saponinas presentan un enlace heterosídico en el C-3, que por hidrólisis se escinden en sapogeninas y azúcares, siendo entre estos últimos los más frecuentes glucosa, sacarosa, arabinosa, ramnosa, xilosa y ácidos urónicos relacionados.

Las saponinas poseen elevado peso molecular, y su aislamiento en estado puro ofrece ciertas dificultades. Son solubles en agua, etanol y metanol diluidos y en caliente; se extraen con solventes polares, se hidrolizan y se obtienen sus geninas. Las sapogeninas son prácticamente insolubles en agua, solubles en solventes poco polares como diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono y éter. Las saponinas se pueden localizar en cualquier órgano de la planta: raíz, hojas, semillas, corteza, etc. ^(6, 7, 14, 15, 16, 17, 18)

SAPONINAS ESTEROIDALES

Están menos ampliamente distribuidas en la naturaleza que las saponinas triterpenoides. Los estudios fitoquímicos han demostrado su presencia en muchas familias de las monocotiledóneas, especialmente en Dioscoreaceae (por ejemplo, *Dioscorea spp.*), Amaryllidaceae (*Agave spp.*) y Liliaceae (*Yucca* y *Trillium spp.*). Entre las dicotiledóneas, la presencia de diosgenina en la alholva (Leguminosae) y alcaloides esteroídicos en *Solanum* (Solanaceae), posee importancia potencial. Algunas especies de *Strophanthus* y *Digitalis* contienen, tanto saponinas esteroidales, como heterósidos cardiacos. Las saponinas esteroidales son de gran interés e importancia por su relación con compuestos como las hormonas sexuales, cortisona, esteroides diuréticos, vitamina D y heterósidos cardiacos. ^(6, 7, 14, 15, 16, 17, 18)

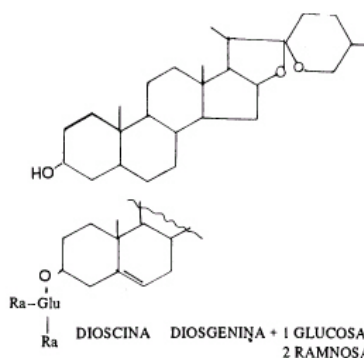


Figura N°7. Estructura química de saponinas esteroidales.

SAPONINAS TRITERPÉNICAS

A diferencia de las saponinas esteroidales, las triterpénicas son raras en las monocotiledóneas. Abundan en muchas familias de las dicotiledóneas, especialmente en Caryophyllaceae, Sapindaceae, Polygalaceae y Sapotaceae. Muchas otras familias de las dicotiledóneas, en las que también se han hallado estas saponinas, son Phytolaccaceae, Chenopodiaceae, Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Linaceae, Zygophyllaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Cucurbitaceae, Araliaceae, Umbelliferae, Primulaceae, Oleaceae, Lobeliaceae, Campanulaceae, Rubiaceae y Compositaceae. (19, 20, 21, 22, 23, 24, 25)

En estas saponinas, la sapogenina está unida a una cadena de azúcares o de ácido urónico, o ambos, generalmente en la posición de C-3. Las saponinas triterpénicas se han clasificado en tres grupos, representados por α -amirina, β -amirina y lupeol. Las plantas contienen frecuentemente cantidades considerables de saponinas triterpénicas. Así, la raíz de prímula contiene alrededor del 5-10%; la raíz de regaliz entre 2-12 % de ácido glicirricico; la corteza de quillaja contiene hasta un 10% las semillas de castaño de Indias, hasta el 13 % de aescina. (6, 7, 14, 15, 16, 17, 18)

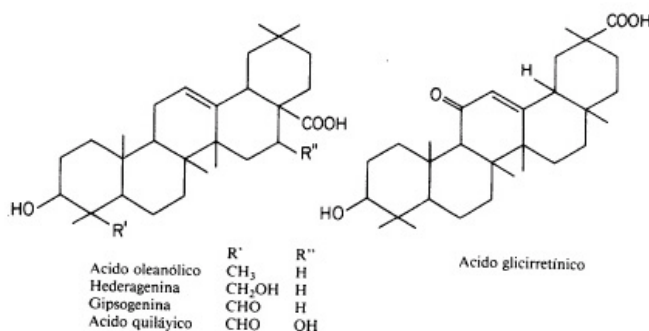


Figura N°8. Estructura química de saponinas triterpénicas.

La presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénicas, se reconoce por el ensayo de espuma, se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2mm de espesor y si persiste por más de 2 min. (6, 7, 14, 15, 16, 17, 18)

Las saponinas dan coloraciones específicas a los reactivos según su genina, sea de tipo esterooidal ó triterpénicas. Así, con el R. Liebermann-Burchard las sapogeninas esteroidales presentan coloración verde-azul, mientras que las sapogeninas triterpénicas dan coloración rosado-púrpura; con el R. de Noller, específica para saponinas triterpénicas, presentan cambios de coloración en los siguientes 60 minutos; con el R. Salkowsky y el R. Rosenthaler presentan coloraciones amarillo rojizo, con el R. Tricloroacético dan coloración que van del naranja al rojo; con el R. Vainillina HCl al 1% las sapogeninas presentan coloraciones variables; con el R. de Molish o Antrona las saponinas forman un anillo violeta y azul verdoso respectivamente. La detección por Cromatografía en Capa Fina (CCF) se realiza generalmente en placas de silicagel; los sistemas de solventes empleados para su desarrollo son muy variado: CHCl_3 -EtOAc (1:1); CHCl_3 -EtOH (19:1); Bz-MeOH (23:2); etc. Como agentes cromogénicos son frecuentes los reactivos de Liebermann-Burchard, Vainillina- H_3PO_4 , Carr Price, H_2SO_4 al 50%. En todos los casos el calentamiento de la placa origina colores variados. (6, 7, 14, 15, 16, 17, 18, 26, 27, 28, 29, 30)

Compuestos triterpénicos y esteroides en general, muestran a través del análisis de IR señales a $3650\text{-}3590\text{ cm}^{-1}$ y a 1055 cm^{-1} correspondientes a OH^- secundarios, y también señales a $2960\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ y $1485\text{-}1445\text{ cm}^{-1}$. En las saponinas esteroidales son además características las absorciones del anillo espiroacetal en forma de cuatro bandas llamadas: A, B, C y D aproximadamente a 980, 920, 900 y 860 cm^{-1} respectivamente; las sapogeninas triterpénicas carecen de estas absorciones. (14, 15, 16, 17, 18, 26, 27, 28, 29, 30)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

MATERIAL DE LABORATORIO

- Tubos de prueba 13 x 100, 16 x 125 T/R y 20 x 150 S/T
- Probetas de vidrio de 50, 100 y 500 mL
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Peras de Bromo
- Embudos de vidrio
- Matraz Erlenmeyer
- Beacker de 100 y 250 mL
- Balón
- Tubo refrigerante en bolas
- Placas Petri
- Cromatofolios Merck Silicagel 60 F₂₅₄
- Cubas Cromatográficas
- Gradillas de Metal
- Mechero Bunsen
- Jaulas
- Dispensador de medio de cultivo
- Patrón Turbidimétrico (Escala de Mac Farland)

EQUIPOS

- Balanza Analítica Sartorius
- Balanza de precisión
- Estufa Memmert
- Molino de Cuchillas Willey
- Lámpara de luz Ultravioleta (254nm y 366nm)
- Autoclave
- Atemperador
- Coagulador de fondo inclinado
- Cabina de Flujo Laminar Vertical

REACTIVOS

- Reactivos de coloración: R. Shinoda, R. Tricloruro de Fierro, R. de Liebermann-Burchard, R. Vainillina HCl, R. de Noller, R. de Borntrager, R. Dragendorff, R. de Mayer, R. de Rosenhein, R. de Molish, etc.
- Reveladores: R. Liebermann Burchard, R. Vainillin Fosfórico, R. Dragendorff, R. Iodoplatinato.
- Solventes: Etanol 96°
n-Hexano
Cloroformo
Acetato de Etilo
Diclorometano
- Otros: Fenol
Sulfato de Sodio Anhidro
Verde de Malaquita

MATERIAL BIOLÓGICO

- Raíces de *Spergularia media* (L.) Griseb “Choquetacarpo”.
- Cepas de *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV.
- Ratas albinas, especie *Rattus norvegicus*, cepa Holtzman.

3.2 COLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PROBLEMA

La especie en estudio *Spergularia media* (L.) Griseb “Choquetacarpo”, fue recolectada en la comunidad de Ninanmarca del departamento del Cuzco, en época de florecimiento; se verificó que las raíces se encuentren limpias y en buen estado. La estabilización de las raíces de *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpo” se realizó a temperatura ambiente, bajo sombra por 48 horas, posteriormente se desecó en estufa a 40°C durante 72 horas. La molienda se realizó en molino de cuchillas, a fin de evitar la absorción de humedad y contaminación que pudiera alterar algunos de sus constituyentes químicos, el polvo obtenido se envasó en frascos ámbar rotulados con tapa hermética para su conservación. ^(17, 18, 27, 28)

3.3 ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO

El estudio preliminar se efectuó según el método Fitoquímico simplificado de la Cátedra de Farmacognosia, se realizó una extracción en Etanol 96°, para identificar la presencia de los constituyentes químicos mayoritarios en la planta (Figura N°9). Posteriormente se realizó extracciones específicas para alcaloides (Figura N°10) y saponinas-sapogeninas (Figura N°11) y determinación de carbohidratos (Figura N°12). Se realizaron ensayos cualitativos mediante reacciones de coloración para cada grupo y ensayos cromatográficos en capa fina (CCF).^(17, 18, 27, 28)



Fotografía N°3. Raíces de *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpo”

3.3.1 EXTRACCIÓN ETANÓLICA

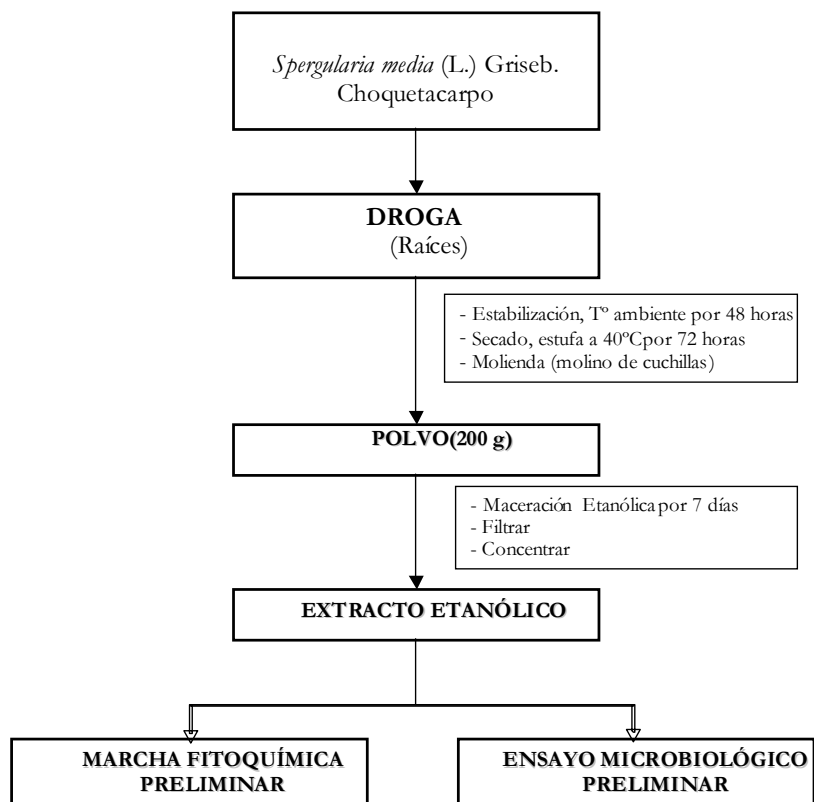


Figura N°9. Marcha Fitoquímica Preliminar.

3.3.2 EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES

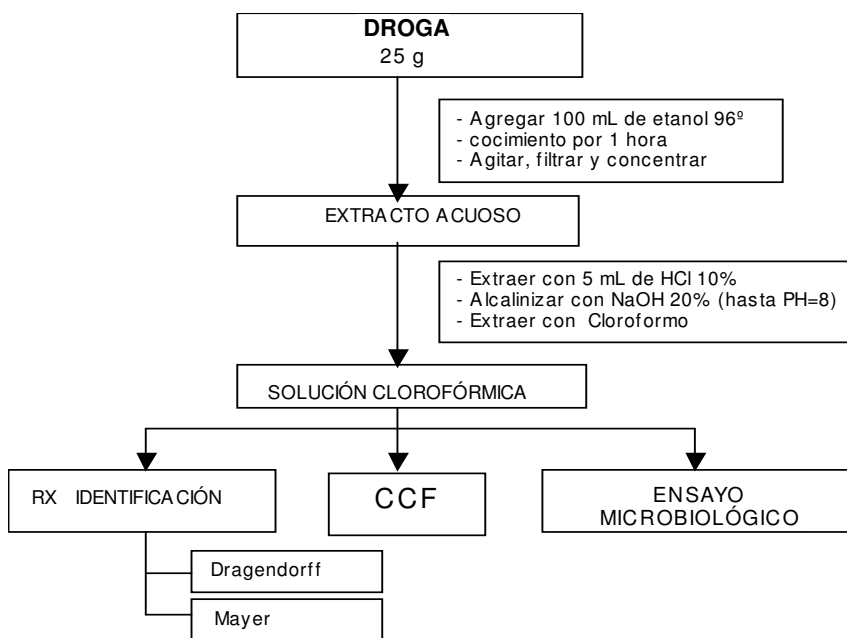


Figura N°10. Extracción de alcaloides.

3.3.3 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

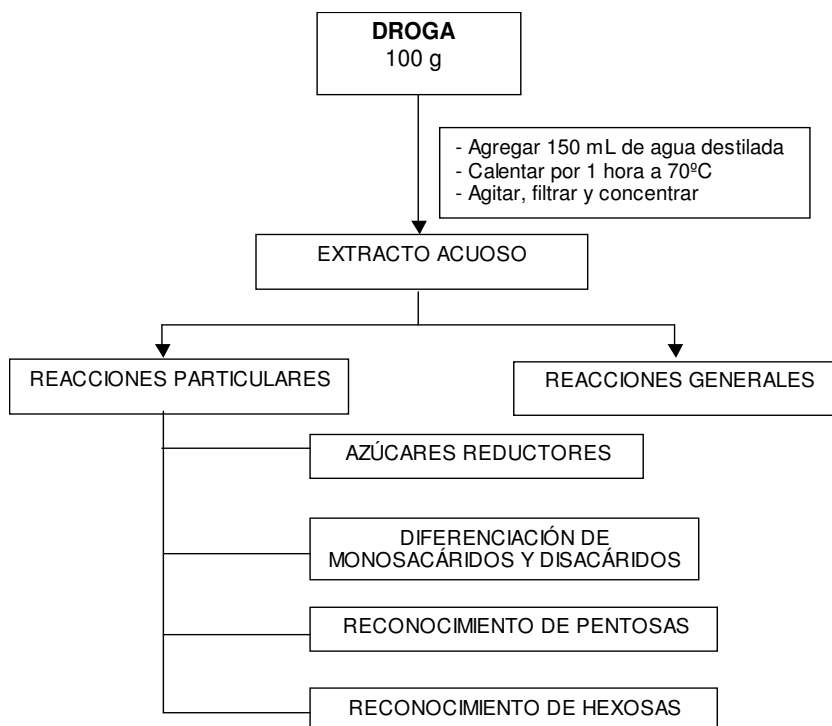


Figura N°11. Determinación de carbohidratos.

3.4 OBTENCIÓN DE SAPONINAS – SAPOGENINAS

El diagrama de flujo realizado para la obtención de saponinas y su posterior hidrólisis en sapogeninas, se observa en (Figura N°12). (17, 18, 26, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41)

3.4.1 EXTRACCIÓN

Se maceraron 600 gramos de droga seca y molida de la planta, en 1000 mL de una solución de etanol:agua (1:1) durante 24 horas, luego se realizó un reflujo cada 6 horas (extracción múltiple), hasta agotamiento de la muestra. Se reunieron los extractos, se filtraron y concentraron a 1/3 de volumen en baño maría.

3.4.2 DESENGRASADO Y DESPIGMENTADO

El extracto obtenido fue despigmentado y desengrasado con n-Hexano, con el fin de eliminar materia grasa, pigmentos, ceras y cualquier otro componente que pudiera interferir.

3.4.3 HIDRÓLISIS

Se agregó un volumen de ácido sulfúrico 2% y sometió a reflujo durante 12 horas; comprobándose la hidrólisis de saponinas por reacciones de identificación e índice de espuma. La solución hidrolizada fue sometida a extracción con diclorometano para la separación de las sapogeninas crudas.

3.4.4 PURIFICACIÓN DE SAPOGENINAS CRUDAS

Como la solución se encuentra ácida se procedió a lavar y neutralizar con agua y carbonato de sodio, tantas veces sea necesario. Luego la solución fue tratada con sulfato de sodio anhidro para eliminar residuos de agua. Se filtró y procedió a evaporar al vacío para su purificación.

3.4.5 IDENTIFICACIÓN DE SAPOGENINAS

La identificación del núcleo químico al cual pertenecen las sapogeninas se realizó mediante:

Reacciones de coloración

- R. Liebermann-Burchard
- R. Noller
- R. Salkowski
- R. Tricloroacético
- R. Vainillina HCl
- R. Rosenthaler

Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Se empleó el siguiente sistema:

Fase estacionaria:	Silica gel 60 F ₂₅₄
Fase móvil:	Cloroformo: acetato de etilo (9:1)
Reveladores:	Liebermann-Burchard Vainillín fosfórico

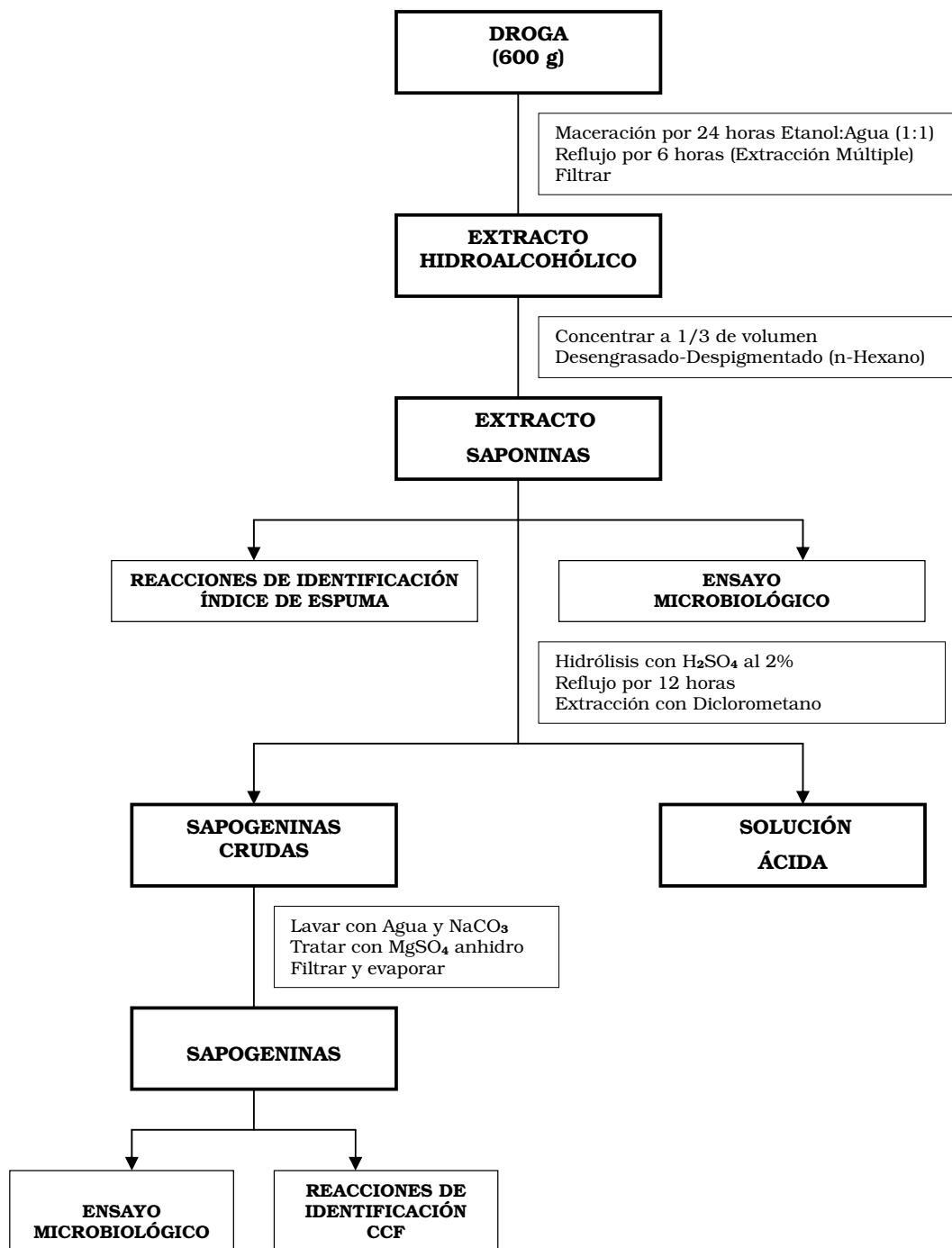


Figura N°12. Obtención de saponinas – sapogeninas.

3.5 ENSAYOS BIOLÓGICOS

3.5.1 ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

3.5.1.1 MÉTODO OECD 423 (OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICAL).

PROCEDIMIENTO

- ❖ Selección de la especie: Se emplearon 6 ratas albinas hembras, de la especie *Rattus norvegicus*, cepa Holtzman, procedientes del Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de Productos Biológicos (Bioterio); con peso promedio de 248 g y 2 meses de edad.
- ❖ Condiciones de alojamiento y alimentación: Los animales se mantuvieron a una temperatura de 22°C, con una humedad inferior a 40%. Se alimentaron con dieta convencional y un suministro continuo de agua potable.
- ❖ Acondicionamiento de los animales: Los animales fueron seleccionados al azar y marcados para facilitar su identificación, fueron mantenidos en jaulas durante 5 días antes del inicio del ensayo, para permitir su aclimatación.
- ❖ Preparación de las dosis: De acuerdo a la solubilidad de la droga, fue suspendida en agua, y se prepararon 2 concentraciones a razón de 2000mg/kg y 5000mg/kg según el peso de cada rata.
- ❖ Administración de la dosis: Se administró en unidosis, utilizando una sonda gástrica; los animales fueron puestos en ayuno la noche anterior, previo al ensayo.
- ❖ Número de animales y niveles de dosis: Para cada dosis se emplearon 3 ratas, siendo la dosis inicial de 2000 mg/Kg.

Los animales fueron observados individualmente después de la administración, por lo menos una vez durante los primeros 30 minutos, cada hora durante las primeras 4 horas y cada día a partir del mismo; por 14 días. ⁽⁴²⁾

3.5.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA

Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud (INS). Este método se fundamenta en la determinación de la sensibilidad del *Micobacterium tuberculosis*, frente a las diferentes drogas antituberculosas. ^(43, 44, 45, 46, 47)

3.5.2.1 MÉTODO DE LAS PROPORCIONES DE CANETTI, RIST Y GROSSET

❖ MUESTRA: EXTRACTO ETANÓLICO

- Se utilizó el extracto seco etanólico (EOH) y se llevó a 5 concentraciones, en Medio Lowenstein Jensen (MLJ):

Se pesó 600 mg de EOH (en 18 mL de MLJ) $C_{OH1} = 33.33 \text{ mg/mL}$

Se pesó 100 mg de EOH (en 18 mL de MLJ) $C_{OH2} = 5.5 \text{ mg/mL}$

Se pesó 10 mg de EOH (en 18 mL de MLJ) $C_{OH3} = 0.55 \text{ mg/mL}$

Se pesó 2 mg de EOH (en 18 mL de MLJ) $C_{OH4} = 0.11 \text{ mg/mL}$

Se pesó 0.2 mg de EOH (en 18 mL de MLJ) $C_{OH5} = 0.011 \text{ mg/mL}$

❖ MUESTRA: EXTRACTO ALCALOIDE

- Se utilizó el extracto seco de alcaloides (ESA) y se trabajó con una concentración:
Se pesó 54 mg de ESA (en 36 mL de MLJ) $C_A = 1.5 \text{ mg/mL}$

❖ MUESTRA: EXTRACTO DE SAPONINAS

- Se utilizó el extracto de saponinas (ES) y se llevó a 2 concentraciones:

Se pesó 1200 mg de ES (en 36 mL de MLJ) $C_{ES1} = 33.33 \text{ mg/mL}$

Se pesó 2400 mg de ES (en 36 mL de MLJ) $C_{ES2} = 66.66 \text{ mg/mL}$

❖ MUESTRA: EXTRACTO SECO DE SAPOGENINAS

- Se utilizó el extracto seco de sapogeninas (ESS) llevándolo a dos concentraciones:

Se pesó 145 mg de ESS (en 36 mL de MLJ) $C_{S1} = 4 \text{ mg/mL}$

Se pesó 430 mg de ESS (en 36 mL de MLJ) $C_{S2} = 12 \text{ mg/mL}$

Seguidamente se dispensa 4.5 mL de medio a cada tubo (c/droga y controles). Finalmente se llevan los tubos preparados al coagulador a una temperatura de 85°C por 45 minutos (Figura N°13).

PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACILAR

- Con ayuda de un asa metálica se toma una cantidad de colonias de la cepa *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV.
- Se colocó en frasco homogeneizador con 0.5 mL de agua estéril y se agita hasta lograr una suspensión homogénea.
- Se agregó agua destilada estéril c.s.p. 5 mL y se agitó suavemente, luego con pipeta pasteur, se transfiere en tubo de ensayo para comparar la turbidez con una suspensión patrón (Escala de Mac Farland N° 1).

PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

- A partir de ésta suspensión madre se efectúa diluciones 1:10, siendo las siguientes: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} .
- Según el método, solo se trabaja con las diluciones: 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-6} .

INOCULACIÓN

- Se inoculan 0.2 mL de las diluciones preparadas a cada tubo:

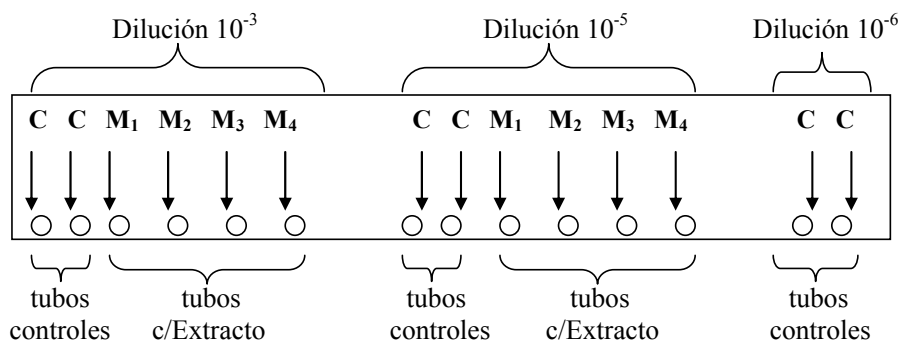


Figura N°13. Distribución de los tubos con MLJ, para su inoculación.

Observaciones: Para la muestra etanólica se trabajó solo por duplicado (M₁ y M₂), para cada dilución.

INCUBACIÓN

- Una vez realizada la inoculación, se colocan los tubos en bandejas de metal en estufa a temperatura de 37°C.
- Inicialmente se dejaron las tapas ligeramente cerradas, procediéndose a cerrar después de las 72 horas.
- A partir de este momento se efectuaron dos lecturas de prueba, a las 30 y 45 días de incubación respectivamente.

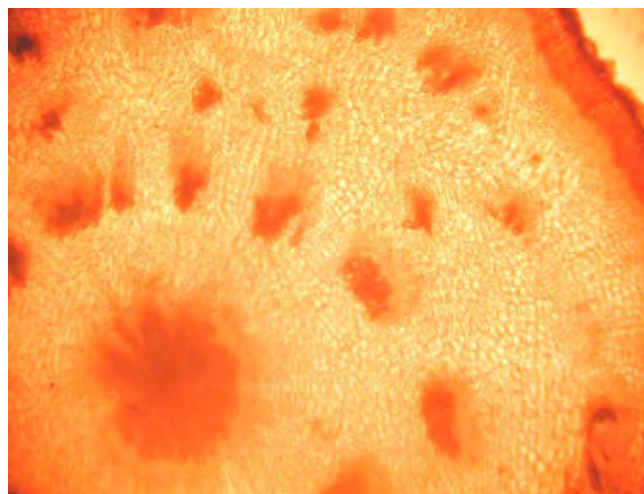
IV. RESULTADOS

4.1 DEL ESTUDIO BOTÁNICO

- De acuerdo a sus características morfológicas: raíz tipo napiforme (Fotografía N°3). Hoja linear, filiforme tubulado. Tallos postrados, con nudos prominentes, de unos 10 cm. de longitud. Inflorescencia de tipo cimosa, pentámera.
- De acuerdo a sus características histológicas: la raíz posee una estructura interna primaria, zona medular pequeña y presencia de abundantes vasos leñosos (Fotografía N° 4-7).



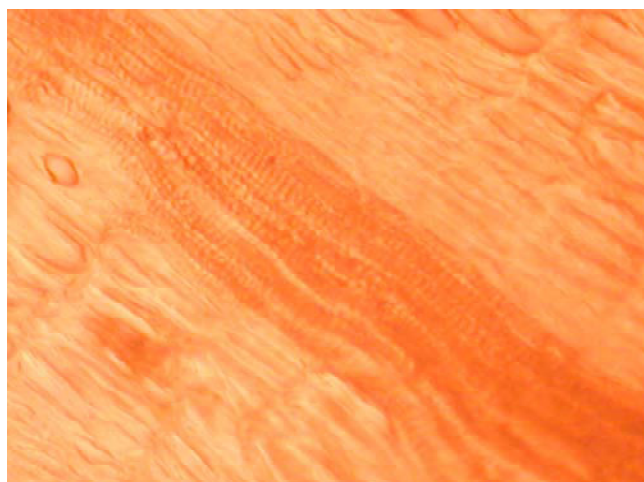
Fotografía N°4. Corte transversal de raíz con estructura interna primaria, se observa el xilema. Floema y zona vascular.



Fotografía N°5. Corte transversal de raíz con estructura interna primaria, se observa la zona medular y la presencia de vasos leñosos



Fotografía N°6. Corte transversal de raíz. Zona medular.



Fotografía N°7. Corte longitudinal de raíz. Presencia de vaso leñoso tipo espiralado.

4.2 DEL ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO

Para obtener información de sus constituyentes químicos se realizó la Marcha Fitoquímica encontrándose que la raíz (droga) presenta los constituyentes químicos que se indica en la Tabla N°2. Para la determinación de carbohidratos (Tabla N°3), alcaloides (Tabla N°4 y Fotografía N°8).

Tabla N°2. Resultados de la Marcha Fitoquímica Preliminar.

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	CARACTERÍSTICA	REACCIÓN
Carbohidratos	R. Molish	Color violeta	+++
	R. Antrona	Color verde	+++
Saponinas	R. Liebermann Burchard	Color rosado	+++
	R. de espuma	Presencia de Espuma	+++
Glicósidos	R. Vainillina HCl	Anillo violáceo en interfase	+++
Alcaloides	R. Dragendorff	PP rojo-naranja	+
	R. Mayer	PP blanco	+
Flavonoides	R. Shinoda	Color rojo	-
Taninos	FeCl ₃	Verde/azul	-

Tabla N°3. Resultados de la Determinación de Carbohidratos

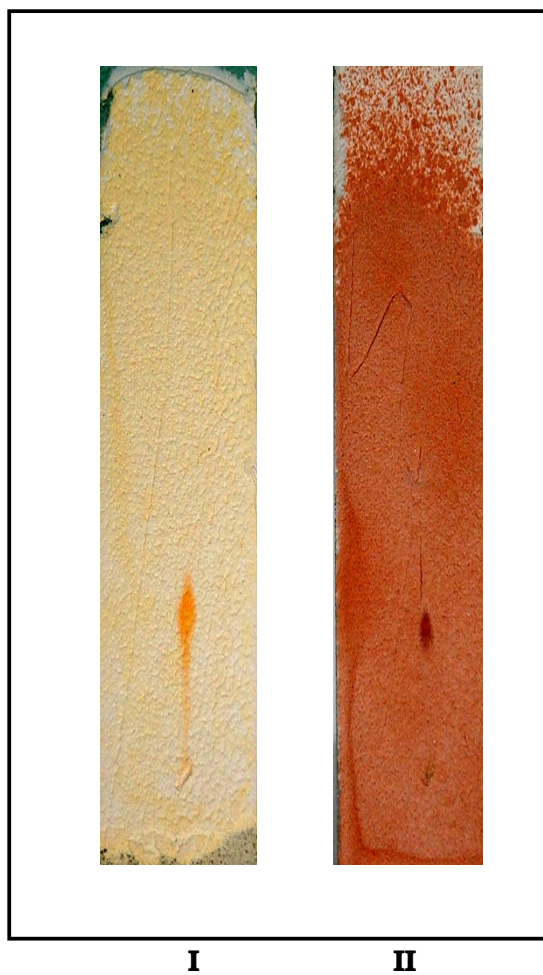
REACCIÓN	REACTIVO	CARACTERÍSTICA	RESULTADO
Reacciones Generales	R. Molish	Color violeta	+++
	R. Antrona	Color verde	+++
Reacciones de Azúcares Reductores	R. Fehling	PP. rojo ladrillo	+++
	R. Benedict	PP. rojo ladrillo	+++
	R. Trommer	PP. negro	+++
	R. Brown	Color amarillo	+++
	R. Nylander	PP. negro	+++
	R. Tollens	Espejo de plata	+++
Diferenciación Monosacáridos Disacáridos	R. de Barfoed	PP. rojo ladrillo	+++
Reacciones Aldosas	R. de Pelouze	Amarillo naranja	+++
Reacciones Cetosas	R. Selivanoff	Rojo carmín	-

LEYENDA:

(+++)	:	Abundante
(++)	:	Moderado
(+)	:	Escaso
(-)	:	Negativo

Tabla N°4. Resultados de la Extracción-Cromatografía de Alcaloides

REACCIONES DE COLORACION			
REACCIÓN	REACTIVO	CARACTERÍSTICA	RESULTADO
Reacciones Identificación	R. Dragendorff	PP. anaranjado	+
	R. Mayer	PP. blanco	+
CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA			
REVELADOR			
R. Dragendorff	R. Iodoplatinato	RF	
Naranja	Azul-violeta	0.42	



Fotografía N°8. Cromatografía en capa fina de alcaloides.

Fase estacionaria: Silica Gel G F₂₅₄
 Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1)
 Revelador: Dragendorff (I)
 Iodoplatinato (II)

4.3 DE LA OBTENCIÓN DE SAPONINAS - SAPOGENINAS

La presencia de saponinas y sapogeninas fueron identificadas por reacciones de coloración (Tabla N°5-6) y Cromatografía en Capa Fina. (Tabla N°7 y Fotografía N°9-11).

Tabla N°5. Resultados de la identificación de saponinas.

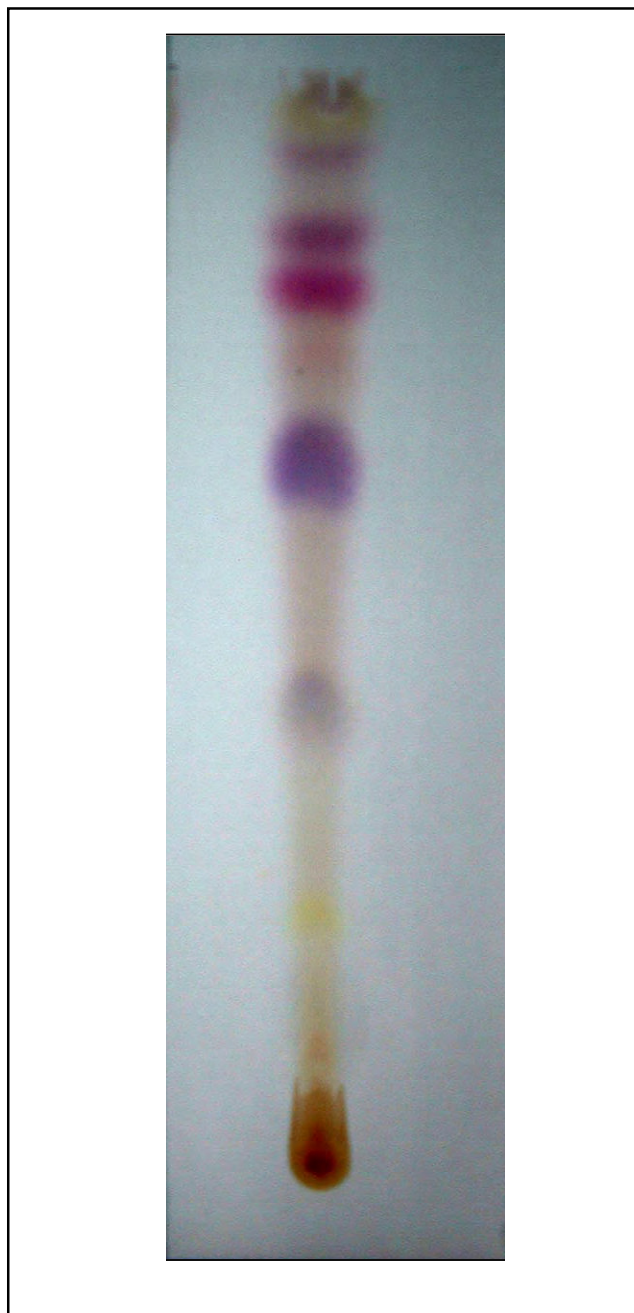
REACTIVO	CARACTERÍSTICA	REACCIÓN
R. Liebermann Burchard	Rosado	+++
R. Antrona	Verde	+++
Índice de Espuma	Formación de espuma persistente por 30 minutos	+++

Tabla N°6. Resultados de la identificación de sapogeninas.

REACTIVO	CARACTERÍSTICA	REACCIÓN
R. Liebermann Burchard	Rosado	+++
R. Salkowski	Amarillo	+++
R. Vainillina HCl	Violeta	+++
R. Tricloroacético	Naranja	+++
R. Rosenthaler	Lila	+++
R. Noller	Púrpura	+++

Tabla N°7. Resultados de la cromatografía en capa fina de sapogeninas.

BANDAS	REVELADORES		RF
	Liebermann-Bourchard	Vainillin Fosfórico	
I	Celeste	Amarillo	0.21
II	Azul	Azul tenue	0.39
III	Violeta tenue	Violeta	0.60
IV	Rosado	Lila	0.82
V	Amarillo naranja	Lila tenue	0.85
VI	Violeta tenue	Violeta tenue	0.92

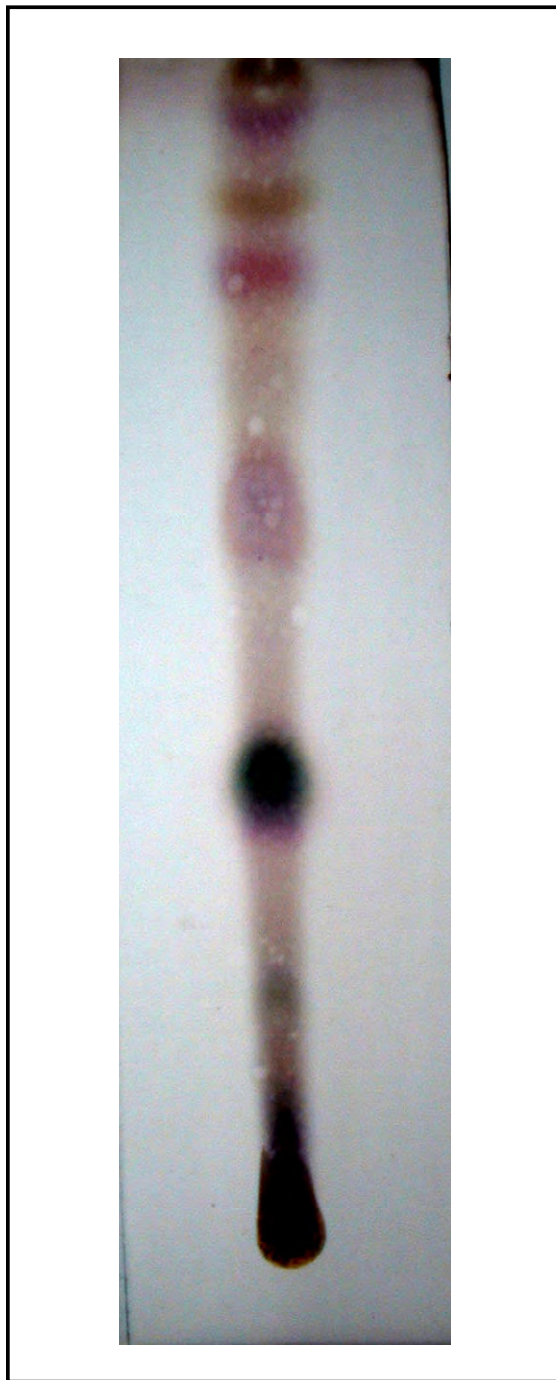


Fotografía N°9. Cromatografía en capa fina de saponinas.

Fase estacionaria: Silica Gel 60 F₂₅₄

Fase móvil: Cloroformo: Acetato de etilo (9:1)

Revelador: Vainillin Fosfórico

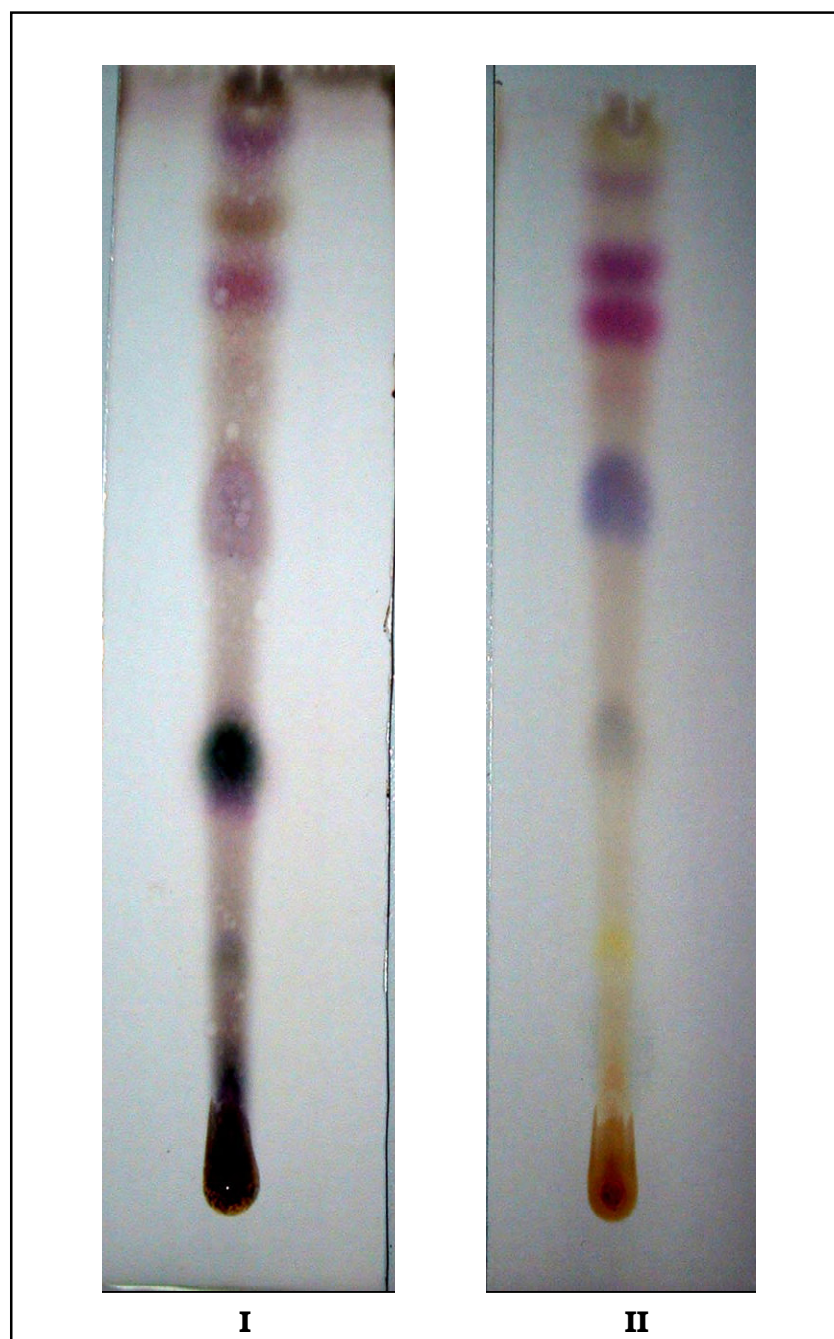


Fotografía N° 10. Cromatografía en capa fina de sapogeninas.

Fase estacionaria: Silica Gel 60 F₂₅₄

Fase móvil: Cloroformo: Acetato de etilo (9:1)

Revelador: Liebermann - Burchard



Fotografía N°11. Cromatografía en capa fina de sapogeninas.

Fase estacionaria: Silica Gel 60 F₂₅₄
Fase móvil: Cloroformo: Acetato de etilo (9:1)
Revelador: Liebermann-Burchard (I)
Vainillin Fosfórico (II)

4.4. DEL ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

El ensayo de toxicidad aguda a la raíz de *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpó”, la dosis administrada en ratas se expresa en: gramos de extracto seco por kilogramo de peso corporal (Tabla N°8), según el Ensayo de Toxicidad Aguda por el Método OECD-423. OMS (Tabla N°9).

Tabla N°8. Resultados del ensayo de toxicidad aguda oral

ESPECIE	N° muertes / Dosis	C ₁ 2000 mg/kg	C ₂ 5000 mg/kg	DL ₅₀
<i>Spergularia media</i> (L.) Griseb “Choquetacarpó”	N° ratas	3	3	> 5000 mg/kg de peso corporal
	N° muertes	0	0	

Tabla N°9. Clasificación de toxicidad aguda por el método OECD-423. OMS.

RANGO DE TOXICIDAD	CLASIFICACIÓN	DL ₅₀ (RATAS)	DL ₅₀ (CONEJO)	POSIBLE DL ₅₀ HUMANOS
1	Extremadamente Tóxico	>1mg/kg	<5 mg/kg	50 mg
2	Altamente Tóxico	1mg-50 mg/kg	5mg-50 mg/kg	4 mL
3	Moderadamente Tóxico	50mg-500mg/kg	50mg-350mg/kg	30 g
4	Ligeramente Tóxico	500mg-5g/kg	350mg-3g/kg	250 g
5	Atóxico	5g - 15g/kg	3g - 25g/kg	1 Litro
6	Relativamente Inocuo	>15g/kg	>25g/kg	> 1 Litro

Fuente: Internacional Programme of Chemical Safety-World Health Organization; WHO/IPCS/90.

4.5. DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA

Las concentraciones empleadas para los ensayos microbiológicos “in-vitro”, se tomaron como referencia la dosis popular: 20g/L de raíz de *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarp”.

4.5.1 EXTRACTO ETANÓLICO (C_{OH})

Se tuvo como resultado que la concentración de 33.33 mg/mL del extracto alcohólico, posee un efecto inhibitorio frente a la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV. (Tabla N°10).

Tabla N°10. Resultados del ensayo microbiológico del extracto etanólico.

DILUCIONES	1 0 ⁻³				1 0 ⁻⁵				1 0 ⁻⁶	
MUESTRAS	C	C	M ₁	M ₂	C	C	M ₁	M ₂	C	C
EXTRACTO ETANÓLICO: COH₁ (33.33 mg/mL)										
30 DÍAS	200	210	10	14	20	24	4	3	2	4
45 DÍAS	220	200	12	16	18	26	2	3	1	5
EXTRACTO ETANÓLICO: COH₂ (5.55 mg/mL)										
30 DÍAS	190	210	120	140	15	18	12	13	6	2
45 DÍAS	220	200	128	150	21	19	17	15	3	2
EXTRACTO ETANÓLICO: COH₃ (0.55 mg/mL)										
30 DÍAS	200	220	200	210	20	18	22	19	1	5
45 DÍAS	200	210	180	190	27	23	24	21	2	5
EXTRACTO ETANÓLICO: COH₄ (0.11 mg/mL)										
30 DÍAS	210	220	200	180	26	20	23	26	4	2
45 DÍAS	220	200	190	200	16	19	18	17	3	1
EXTRACTO ETANÓLICO: COH₅ (0.011 mg/mL)										
30 DÍAS	220	200	210	190	22	23	21	20	4	3
45 DÍAS	190	200	200	210	18	20	19	21	3	2

4.5.2 EXTRACTO ALCALOIDE (A)

Se tuvo como resultado que las concentraciones de 1.5 mg/mL del extracto de alcaloides no poseen efecto bactericida frente a la cepa *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV (Tabla N°11).

Tabla N°11. Resultados del ensayo microbiológico del extracto de alcaloides.

EXTRACTO ALCALOIDE: A (1.5 mg/mL)														
DILUCIONES	10 ⁻³						10 ⁻⁵						10 ⁻⁶	
MUESTRAS	C	C	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	C	C	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	C	C
30 DÍAS	220	210	190	230	180	190	32	21	26	45	24	15	3	2
45 DÍAS	200	210	220	200	190	200	31	20	26	40	26	18	4	6

4.5.3 EXTRACTO DE SAPONINAS (ES)

Se tuvo como resultado que las concentraciones de 33.33 mg/mL y 66.66 mg/mL del extracto de saponinas, poseen un efecto inhibitorio marcado frente a la cepa de *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV (Tabla N°12).

Tabla N°12. Resultados del ensayo microbiológico del extracto de saponinas.

EXTRACTO SAPONINAS : ES ₁ (33.33 mg/mL)														
DILUCIONES	10 ⁻³						10 ⁻⁵						10 ⁻⁶	
MUESTRAS	C	C	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	C	C	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	C	C
30 DÍAS	200	210	4	6	5	4	16	21	1	1	--	--	3	1
45 DÍAS	200	210	2	4	4	2	18	14	2	1	--	1	3	5
EXTRACTO SAPONINAS: ES ₂ (66.66 mg/mL)														
DILUCIONES	10 ⁻³						10 ⁻⁵						10 ⁻⁶	
MUESTRAS	C	C	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	C	C	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	C	C
30 DÍAS	220	200	1	4	--	1	38	22	--	--	--	--	4	6
45 DÍAS	200	220	1	2	--	1	12	20	--	--	--	1	2	2

4.5.4 EXTRACTO DE SAPOGENINAS (ESS)

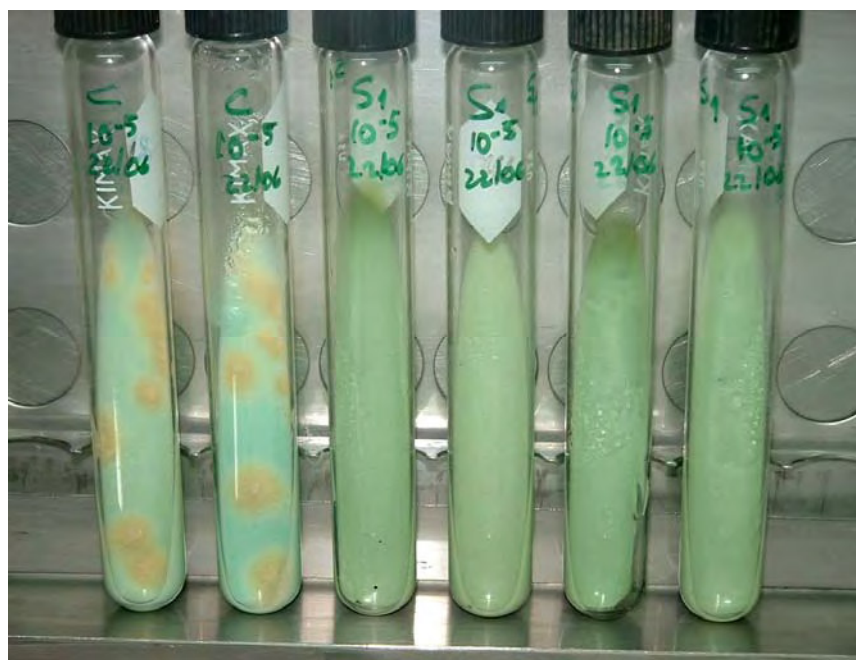
Se tuvo como resultado que las concentraciones de 4 mg/mL y 12 mg/mL del extracto de sapogeninas, poseen un efecto inhibitorio bactericida frente a la cepa *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV (Tabla N°13) y (Fotografía N°12-15).

Tabla N°13. Resultados del ensayo microbiológico del extracto de sapogeninas.

EXTRACTO SAPOGENINAS : S ₁ (4 mg/mL)														
DILUCIONES	10 ⁻³						10 ⁻⁵						10 ⁻⁶	
MUESTRAS	C	C	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	C	C	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	C	C
30 DÍAS	230	200	--	--	--	--	15	12	--	--	--	--	2	5
45 DÍAS	210	220	--	--	--	--	18	14	--	--	--	--	3	5
EXTRACTO SAPOGENINAS : S ₂ (12 mg/mL)														
DILUCIONES	10 ⁻³						10 ⁻⁵						10 ⁻⁶	
MUESTRAS	C	C	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	C	C	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	C	C
30 DÍAS	240	220	--	--	--	--	38	22	--	--	--	--	4	6
45 DÍAS	220	200	--	--	--	--	12	20	--	--	--	--	2	2



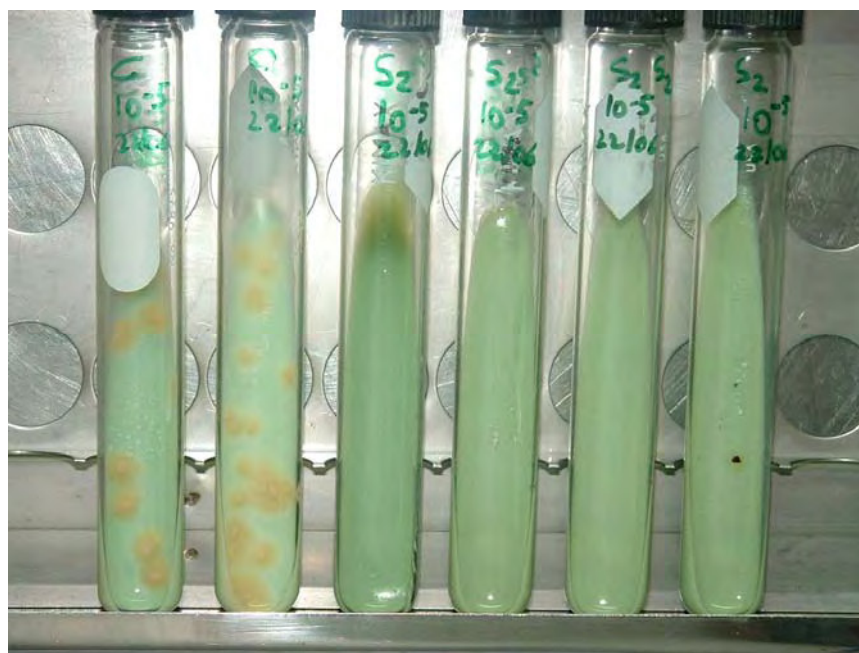
Fotografía N°12. Actividad bactericida del extracto de sapogeninas (S_1) frente al *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV.



Fotografía N°13. Crecimiento de colonias en tubos control y ausencia en tubos con extracto de sapogeninas (S_1).



Fotografía N°14. Actividad bactericida del extracto de sapogeninas (S₂), frente al *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV.



Fotografía N°15. Crecimiento de colonias en tubos control y ausencia en tubos con extracto de sapogeninas (S₂).

4.6 ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO

ANÁLISIS DE VARIANZA

Se plantea la hipótesis para comparar las medias de cada grupo de tratamiento. (Cantidad de dilución y número de días).

➤ **Se compara la media de los subgrupos: muestra prueba (10^{-3}), muestra prueba (10^{-5}) y control (10^{-3}).**

Ho : El efecto de los tratamientos son iguales:

Media (MLJ 10^{-3}) = Media (MLJ 10^{-5}) = Media (Control 10^{-3}).

Ha : El efecto de los tratamientos son diferentes:

Media (MLJ 10^{-3}) \neq Media (MLJ 10^{-5}) \neq Media (Control 10^{-3}).

Tabla N°14. ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-value	
Sapogenina 1 (30 días, 4 mg/mL)	Inter-grupos	73960	2	36980	575.24	1.7E-08	rechazo Ho, p<0.05
	Intra-grupos	450	7	64.286			
	Total	74410	9				
Sapogenina 1 (45 días, 4 mg/mL)	Inter-grupos	73960	2	36980	5177.2	0.0E+00	rechazo Ho, p<0.05
	Intra-grupos	50	7	7.143			
	Total	74010	9				
Sapogenina 2 (30 días, 12 mg/mL)	Inter-grupos	84640	2	42320	1481.2	6.4E-10	rechazo Ho, p<0.05
	Intra-grupos	200	7	28.571			
	Total	84840	9				
Sapogenina 2 (45 días, 12 mg/mL)	Inter-grupos	70560	2	35280	1234.8	1.2E-09	rechazo Ho, p<0.05
	Intra-grupos	200	7	28.571			
	Total	70760	9				

Como p-value < 0.05, Rechazo Ho, entonces se acepta Ha y se determina que el efecto de los tratamientos es diferente para determinar cual de estos tratamientos esta haciendo la diferencia, se utiliza la prueba de Waller-Duncan.

Waller-Duncan: Prueba de comparaciones múltiples basada en un estadístico t. Utiliza la aproximación Bayesiana.

Tabla N°15. Sapogenina 1 (30 días, 4 mg/mL)

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		Subconjunto 1	Subconjunto 2
Muestra Prueba (10^{-3})	4	0	
Muestra Prueba (10^{-5})	4	0	
Control (10^{-3})	2		215

La prueba esta agrupando los datos en dos subconjuntos, en la que se puede apreciar que el efecto del tratamiento es diferente entre las muestras (10^{-3} y 10^{-5}) y el control (10^{-3}). (Para 4mg/mL en 30 días).

Tabla N°16. Sapogenina 1 (45 días, 4 mg/mL)

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		Subconjunto 1	Subconjunto 2
Muestra Prueba (10^{-3})	4	0	
Muestra Prueba (10^{-5})	4	0	
Control (10^{-3})	2		215

La prueba esta agrupando los datos en dos subconjuntos, en la que se puede apreciar que el efecto del tratamiento es diferente en las muestras (10^{-3} y 10^{-5}) y el control (10^{-3}). (Para 4mg/mL en 45 días).

Tabla N°17. Sapogenina 2 (30 días, 12 mg/mL)

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		Subconjunto 1	Subconjunto 2
Muestra Prueba (10^{-3})	4	0	
Muestra Prueba (10^{-5})	4	0	
Control (10^{-3})	2		230

La prueba esta agrupando los datos en dos subconjuntos, en la que se puede apreciar que el efecto del tratamiento es diferente en las muestras (10^{-3} y 10^{-5}) y el control (10^{-3}). (Para 12 mg/mL en 30 días).

Tabla N°18. Sapogenina 2 (45 días, 12 mg/mL)

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		Subconjunto 1	Subconjunto 2
Muestra Prueba (10^{-3})	4	0	
Muestra Prueba (10^{-5})	4	0	
Control (10^{-3})	2		210

La prueba esta agrupando los datos en dos subconjuntos, en la que se puede apreciar que el efecto del tratamiento es diferente en las muestras (10^{-3} y 10^{-5}) y el control (10^{-3}). (Para 12 mg/mL en 45 días).

Se observa el efecto antimicrobiano, por parte de la droga en estudio que impidió el crecimiento de la cepa *Mycobacterium tuberculosis*, que evidencia la diferencia del efecto del tratamiento al rechazar la H_0 .

➤ **Se compara la media de los subgrupos: muestra prueba (10^{-3}), muestra prueba (10^{-5}) y control (10^{-5}).**

H_0 : El efecto de los tratamientos son iguales:

Media (MLJ 10^{-3}) = Media (MLJ 10^{-5}) = Media (Control 10^{-5}).

H_a : El efecto de los tratamientos son diferentes:

Media (MLJ 10^{-3}) \neq Media (MLJ 10^{-5}) \neq Media (Control 10^{-5}).

Tabla N°19. ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-value	
Sapogenina 1 (30 días, 4 mg/mL)	Inter-grupos	291.6	2	145.8	226.8	4.3E-07	rechazo Ho, p<0.05
	Intra-grupos	4.5	7	0.643			
	Total	296.1	9				
Sapogenina 1 (45 días, 4 mg/mL)	Inter-grupos	409.6	2	204.8	179.2	9.7E-07	rechazo Ho, p<0.05
	Intra-grupos	8	7	1.143			
	Total	417.6	9				
Sapogenina 2 (30 días, 12 mg/mL)	Inter-grupos	1440	2	720	39.38	1.6E-04	rechazo Ho, p<0.05
	Intra-grupos	128	7	18.286			
	Total	1568	9				
Sapogenina 2 (45 días, 12 mg/mL)	Inter-grupos	409.6	2	204.8	44.8	1.0E-04	rechazo Ho, p<0.05
	Intra-grupos	32	7	4.571			
	Total	441.6	9				

Como p-value < 0.05, Rechazo Ho, entonces se acepta Ha y se determina que el efecto de los tratamientos son diferentes para determinar cual de estos tratamientos esta haciendo la diferencia, se utiliza la prueba de Waller-Duncan.

Tabla N° 20. Sapogenina 1 (30 días, 4 mg/mL)

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		Subconjunto 1	Subconjunto 2
Muestra Prueba (10^{-3})	4	0	
Muestra Prueba (10^{-5})	4	0	
Control (10^{-5})	2		13.5

La prueba esta agrupando los datos en dos subconjuntos, en la que se puede apreciar que el efecto del tratamiento es diferente entre las muestras (10^{-3} y 10^{-5}) y el control (10^{-5}). (Para 4mg/mL en 30 días).

Tabla N° 21. Sapogenina 1 (45 días, 4 mg/mL)

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		Subconjunto 1	Subconjunto 2
Muestra Prueba (10^{-3})	4	0	
Muestra Prueba (10^{-5})	4	0	
Control (10^{-5})	2		16.0

La prueba esta agrupando los datos en dos subconjuntos, en la que se puede apreciar que el efecto del tratamiento es diferente en las muestras (10^{-3} y 10^{-5}) y el control (10^{-5}). (Para 4mg/mL en 45 días).

Tabla N° 22. Sapogenina 2 (30 días, 12 mg/mL)

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		Subconjunto 1	Subconjunto 2
Muestra Prueba (10^{-3})	4	0	
Muestra Prueba (10^{-5})	4	0	
Control (10^{-5})	2		30.0

La prueba esta agrupando los datos en dos subconjuntos, en la que se puede apreciar que el efecto del tratamiento es diferente en las muestras (10-3 y 10-5) y el control (10-5). (Para 12 mg/mL en 30 días).

Tabla N° 23. Sapogenina 2 (45 días, 12 mg/mL)

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		Subconjunto 1	Subconjunto 2
Muestra Prueba (10 ⁻³)	4	0	
Muestra Prueba (10 ⁻⁵)	4	0	
Control (10 ⁻⁵)	2		16.0

La prueba esta agrupando los datos en dos subconjuntos, en la que se puede apreciar que el efecto del tratamiento es diferente en las muestras (10-3 y 10-5) y el control (10-5). (Para 12 mg/mL en 45 días).

Se observa el efecto antimicrobiano, por parte de la droga en estudio que impidió el crecimiento de la cepa *Mycobacterium tuberculosis*, que evidencia la diferencia del efecto del tratamiento al rechazar la Ho.

➤ **Se compara la media de los subgrupos: muestra prueba (10⁻³), muestra prueba (10⁻⁵) y control (10⁻⁶).**

Ho : El efecto de los tratamientos son iguales:

Media (MLJ 10⁻³) = Media (MLJ 10⁻⁵) = Media (Control 10⁻⁶).

Ha : El efecto de los tratamientos son diferentes:

Media (MLJ 10⁻³) ≠ Media (MLJ 10⁻⁵) ≠ Media (Control 10⁻⁶)

Tabla N° 24. ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-value	
Sapogenina 1 (30 días, 4 mg/mL)	Inter-grupos	19.6	2	9.8	15.244	0.00281	rechazo Ho, p<0.05
	Intra-grupos	4.5	7	0.643			
	Total	24.1	9				
Sapogenina 1 (45 días, 4 mg/mL)	Inter-grupos	25.6	2	12.8	44.8	0.00010	rechazo Ho, p<0.05
	Intra-grupos	2	7	0.286			
	Total	27.6	9				
Sapogenina 2 (30 días, 12 mg/mL)	Inter-grupos	40	2	20	70	0.00002	rechazo Ho, p<0.05
	Intra-grupos	2	7	0.286			
	Total	42	9				
Sapogenina 2 (45 días, 12 mg/mL)	Inter-grupos	6.4	2	3.2			(*)
	Intra-grupos	0	7	0			
	Total	6.4	9				

(*) No puede calcular “F” porque las desviaciones estándar de ambos subgrupos son 0 (cero).

Como p-value < 0.05, Rechazo Ho, entonces se acepta Ha y se determina que el efecto de los tratamientos son diferentes para determinar cual de estos tratamientos esta haciendo la diferencia, se utiliza la prueba de Waller-Duncan.

Tabla N° 25. Sapogenina 1 (30 días, 4 mg/mL)

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		Subconjunto 1	Subconjunto 2
Muestra Prueba (10^{-3})	4	0	
Muestra Prueba (10^{-5})	4	0	
Control (10^{-6})	2		3.5

La prueba esta agrupando los datos en dos subconjuntos, en la que se puede apreciar que el efecto del tratamiento es diferente entre las muestras (10^{-3} y 10^{-5}) y el control (10^{-6}). (Para 4mg/mL en 30 días).

Tabla N° 26. Sapogenina 1 (45 días, 4 mg/mL)

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		Subconjunto 1	Subconjunto 2
Muestra Prueba (10^{-3})	4	0	
Muestra Prueba (10^{-5})	4	0	
Control (10^{-6})	2		4.0

La prueba esta agrupando los datos en dos subconjuntos, en la que se puede apreciar que el efecto del tratamiento es diferente en las muestras (10^{-3} y 10^{-5}) y el control (10^{-6}). (Para 4mg/mL en 45 días).

Tabla N° 27. Sapogenina 2 (30 días, 12 mg/mL)

grupo	N	Subset for alpha = .05	
		Subconjunto 1	Subconjunto 2
Muestra Prueba (10^{-3})	4	0	
Muestra Prueba (10^{-5})	4	0	
Control (10^{-6})	2		5.0

La prueba esta agrupando los datos en dos subconjuntos, en la que se puede apreciar que el efecto del tratamiento es diferente en las muestras (10^{-3} y 10^{-5}) y el control (10^{-6}). (Para 12 mg/mL en 30 días).

Se observa el efecto antimicrobiano, por parte de la droga en estudio que impidió el crecimiento de la cepa *Mycobacterium tuberculosis*, que evidencia la diferencia del efecto del tratamiento al rechazar la H_0 .

V. DISCUSIÓN

La presente investigación ha determinado la actividad antituberculosa del extracto de las raíces de *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpo”, por inhibición en el crecimiento de cepas de *Micobacterium tuberculosis*; y de esta forma, se ha validado científicamente las propiedades terapéuticas en el tratamiento de esta enfermedad. Según reporta la medicina tradicional, choquetacarpo tiene aplicaciones curativas, utilizado con eficiencia en la tuberculosis pulmonar, bronquitis y otras afecciones respiratorias, se usa también en raquitismo y nicturia ^(3, 4); administrando a los pacientes en forma de cocimiento de la raíz; por tal motivo, es necesario remarcar que esta planta puede constituir la droga natural en el tratamiento de la tuberculosis que, como se sabe, ésta es un problema de salud mundial, sobre todo en países del tercer mundo. Surge pues esta especie nativa como una alternativa terapéutica, sobre todo por el conocimiento tradicional y su accesibilidad para la población afectada ^(1, 2, 3, 46).

Se verificó que *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpo” crece en la comunidad de Ninanmarca, provincia Paucartambo, departamento del Cusco, de manera silvestre, y que su población disminuye por efecto de la depredación ⁽³⁾, es decir, la gente arranca y no lo vuelve a sembrar; por tal motivo, este estudio contempla esta situación y busca la racionalización en su utilización, para continuar con los ensayos clínicos y pueda ser considerada como fitomedicamento, coadyuvante en la terapia de tuberculosis.

El uso popular de plantas medicinales en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar se reporta especies de la familia Cariofiláceas, como regaliz y alsine, atribuyéndose el efecto a las saponinas, por su acción expectorante y balsámica; que, sin embargo no ha sido investigada científicamente. ^(4, 6, 17, 27)

Investigaciones realizadas en choquetacarpo ⁽³⁾, comprobaron de manera artesanal que esta planta andina es efectiva en el tratamiento de tuberculosis, trabajaron en pacientes con basiloscopía positiva, quienes fueron tratados con cocimiento de la raíz administrada en tres tomas diarias durante un periodo de cinco meses, observando que al primer mes de tratamiento aumentaba la sudoración y la expectoración y posteriormente las imágenes radiológicas mostraban que las cavernas tuberculosas, característica de esta enfermedad, habían disminuido en más del 60%. Se desconoce los motivos por los cuales no continuaron con el estudio de esta planta, asimismo no se reporta estudios farmacognósticos ni de seguridad para esta especie ⁽³⁾.

La descripción botánica de la estructura interna de la raíz constituye el primer reporte anatómico, la nominación se ha establecido de acuerdo a los lineamientos de histología vegetal clásica y la descripción macroscópica corresponde a la literatura disponible ^(5, 8, 9).

El estudio farmacognóstico de *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpo”, ha permitido obtener los constituyentes químicos mayoritarios de la raíz, observándose la presencia de azúcares reductores, esteroides, glicósidos, alcaloides y saponinas, el metabolito de nuestro interés lo conformaban las saponinas, que están en relación con lo informado por el Instituto de Investigación Central de Química, academia Húngara de Ciencias, donde identificaron una sapogenina de núcleo triterpénico en *Spergularia ramosa*, la que denominaron gypsogenina ^(7, 19, 22, 23, 24, 25, 27). De acuerdo a los resultados del presente trabajo las saponinas fueron hidrolizadas y purificadas para obtener su genina, que por reacciones de coloración y cromatografía en capa fina, probablemente corresponda al núcleo triterpénico, La literatura reporta la presencia de saponinas triterpénicas en las dicotiledóneas, clasificación adoptada por Engler, especialmente en la familia Cariofilaceae, Poligalaceae, Magnoliaceae, Papaveraceae, Cucurbitaceae y Solanaceae entre otras; la especie vegetal objeto de investigación pertenece a una de las familias mencionadas anteriormente (Cariofilaceae) y es un indicio para señalar su posible presencia, que corroboraría la quimiotaxonomía de la familia ^(5, 17).

El ensayo de toxicidad aguda, se encuentra por encima de 5000 mg/kg administrado por vía oral, considerándose prácticamente no tóxica, es decir inocua, de acuerdo al Internacional Programme of Chemical Safety-World Health Organization; WHO/IPCS/90 ⁽⁴²⁾. Dada su aparente seguridad es posible realizar estudios clínicos, dirigidos a pacientes con este tipo de afección y poder formularse bajo una forma farmacéutica.

Con respecto a la actividad antituberculosa se estudió la inhibición del crecimiento del *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV frente al extracto etanólico, extracto de saponinas y extracto de sapogeninas, en los cuales se observaron que en estos dos últimos se obtuvo una mayor inhibición; demostrándose el efecto bactericida. Esto concuerda con trabajos realizados con saponinas en la que se demostró su actividad frente a bacterias, hongos y protozoos. ^(26, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 44). Hasta donde se ha revisado, este es el primer reporte que determina la actividad antituberculosa de esta planta, revelando que los extractos de saponinas y sapogeninas producen una inhibición en el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*; existen estudios realizados con saponinas, cuyo mecanismo de inhibición se postula en la interacción de estos compuestos con los lípidos de la membrana celular. La influencia definitiva de las saponinas sobre el crecimiento del *Micobacterium tuberculosis* puede ser difícil de esclarecer, pero es posible relacionar estos resultados con diferencias en la composición de la envoltura bacteriana.

En general, se conoce que las saponinas se unen con lípidos de la membrana celular (colesterol y otros esteroides) originando poros sobre la membrana, que permiten la entrada de Ca^{+2} y la liberación de proteínas intracelulares al medio extracelular, ocasionando una detención del crecimiento y consecutivamente la lisis celular. ^(12, 26, 39, 40, 41)

VI. CONCLUSIONES

- 6.1 La raíz de la especie *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpó” a través del estudio farmacognóstico muestra la presencia de azúcares reductores; esteroides; glicósidos; alcaloides y saponinas (posiblemente de núcleo triterpénico), según reacciones de coloración específicas y manchas características observadas en la CCF.
- 6.2 El resultado del ensayo de Toxicidad Aguda Oral realizado a las raíces de *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpó”, la clasifica como especie ATÓXICA.
- 6.3 Los extractos de la raíz de *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpó”, presentan actividad antituberculosa frente a cepas de *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV; tal efecto biológico, se deba posiblemente a la presencia de saponinas y sapogeninas triterpénicas.

VII. RECOMENDACIONES

- 7.1 Motivar al estudio de las especies vegetales nativas, tradicionales del Perú, como alternativa terapéutica en atención primaria de la salud.
- 7.2 Continuar con el estudio fitoquímico de la especie *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpó”, con la finalidad de elucidar las estructuras químicas no identificadas, responsables posiblemente del efecto biológico.
- 7.3 Buscar el mayor rendimiento en la obtención de saponinas, se sugiere que, para estudios posteriores con *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpó”, se utilicen otros solventes como metanol, a fin de optimizar su extracción e investigar otras especies naturales nativas, con posible actividad antituberculosa.
- 7.4 Continuar con el estudio microbiológico de *Spergularia media* (L.) Griseb. “Choquetacarpó”, utilizando cepas resistentes de *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV.
- 7.5 Hacer un estudio de factibilidad sobre el aprovechamiento integral de la raíz de la especie en mención, para formularse como fitomedicamento alternativo en la terapia antituberculosa.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MINISTERIO DE SALUD. “Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis”. Dirección General de Salud de las Personas; Lima, diciembre 2006.
2. MINISTERIO DE SALUD. “El Laboratorio de Salud Pública Frente a la Emergencia de la Tuberculosis Resistente”. Lima; 2001.
3. PAREDES GV. “Revista de Medio Ambiente, Salud y Tecnología Ecomundo”. Fundación Andina para el Desarrollo (FANDES). Lima. Jul.1999; Año 3 N°7:8.
4. PAMO R. O. “Las Plantas Medicinales”. Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna. 1992; Vol.5 N° 4.
5. STRASBURGER, E; NOLL, F; SCHINK, H; SCHIMPER, A; “Tratado de Botánica”; editorial Marín. 1981; p. 530-564.
6. KUKLINSKI, C. “Farmacognosia”. Editorial Omega, Barcelona. 2000; p. 155-159.
7. BRUNETON J. “Fitoquímica de Plantas Medicinales”. 2da edición. Editorial Acirbia, Sevilla; 2001. p. 705-706.
8. MC BRIDE JF. “Flora of Peru” Botanical Series Field of Natural History. 1959. Vol. XIII: 578-638.
9. CRONQUIST A. “Botánica Básica”. Editorial Continental. 1981.p
10. BARKSDALE L. “Mycobacterium”. Department of Microbiology, New York University School of Medicine and Medical. March; 1977. Vol 41 N°1: 217-372.
11. RODAS T, GUARDIA J. “Medicina Interna” Tomo I: Tuberculosis. Editorial Garsi S.A. Barcelona. Cap. 12; p. 1141-1151.
12. KONEMAN EW, ALLEN SD Y DOWELL VR. “Diagnostic Microbiology”. Editorial Panamericana. Buenos Aires, 1992; p. 621-655.
13. FLORES J. “Farmacología Humana”; 3ra. Edición; editorial Grafic-Barcelona. 1997. p. 1159-1167
14. VILLAR DEL FRESNO MA. “Farmacognosia General”. Editorial Síntesis, Madrid. 1999; p. 135-138.
15. WAGNER H, HORHAMMER L. “Pharmacognosy and Phitochemistry”. Springer-Verlog. Berlín. 1971 p. 274.

16. KAWASWINA K, MIMAKI Y, SASHIDA Y. “Phytochemistry”. 1991. 30, p. 3063-3067.
17. HARRISON R. “Curso de Farmacognosia I”; Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM; Lima 1987; p. 207-213.
18. ALVAREZ FH, GORRITI GA, ZÁRATE OR. ”Manual de Farmacognosia y Productos Naturales Terapéuticos”. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima; 1992; p. 5-8, 45-47.
19. LACAILLE-DUBOIS MA., ANNE-CLAIRE MO. “Triterpene Saponins from Polygalaceae”. Journal Phytochemistry Reviews. December 2005. Vol. 4 N° 2-3: 139-149.
20. LUO J, KONG L. “Two New Monodesmosidic Triterpene Saponins from *Gypsophila oldhamiana*”. Department of Natural Medicinal Chemistry. Janaury 2006. Vol. 54 N° 8: 1200-1202.
21. NAMDAUNG U, NUNTANA A. “Bioactive Constituents of the Root Bark of *Artocarpus rigidus* subsp.” Department of Chemistry, Faculty of Science. July 2006. Vol. 54 N° 10: 1433-1436.
22. OKAZAKI S, KINOSHITA K, KOYAMA K, TAKAHASHI Y. "New triterpene saponins from *Stenocereus eruca* (Cactaceae)". Journal Natural Medic. September 2006. Vol. 61: 24-29.
23. OKAZAKI S, KINOSHITA K, KOYAMA K, TAKAHASHI Y. "Triterpenoid saponins from cultural plants of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae)". Journal Natural Medic. October 2005. Vol. 60: 49-53.
24. DE TOMMASI N, PIACENTE S, GACS-BAITZ E, DE SIMONE F. “Triterpenoid saponins from *Spergularia ramosa*”. Journal Natural Product. May 1998. Vol. 61 N° 3: 323-327.
25. KONDRATENKO ES, PUTIEVA ZH M, ABUBAKIROV NK. “Triterpene glycosides of plants of the family Caryophyllaceae”. Journal Chemistry of Natural Compounds. July 2005. Vol. 17 N° 4: 303-317.
26. AGUADO CI. “Estudio fitoquímico, determinación de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de *Cestrum auriculatum* L. heritier. “Hierba santa”. Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM Lima; 1997.
27. DOMINGUEZ XA. “Métodos de Investigación Fitoquímica”. Editorial Limusa. 1979; p. 81, 86, 93, 149-150.

28. LOCK DE UGAZ O. “Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales”. Pontificia Universidad Católica; Lima 1994, 2da edición. p. 159-171.
29. MERCK E. “Reactivos de Coloración para Cromatografía en Capa Fina y en Papel”. 1972. p. 26-113.
30. RANDERAT K. “Cromatografía de Capa Fina”. Bilbao 1989. Editorial Urmo, 2da edición, p. 133-151.
31. ADELAKUM EA, OROGUM JI. “Erubigenin, a trihydroxyoleanenoic acid from *Gardenia erubescens*”. Chemistry Department. University of Nigeria. 1997. Volumen LXVIII, N°2: 169-172.
32. ALVARADO P. “Extracción, Separación e Identificación por Cromatografía de Sapogeninas esteroideas del *Agave americana* L. (Maguey)”. Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima; 1969.
33. BONILLA P. “Investigación de los Principios Activos de la Especie *Dioscorea alata*”. Foll. Cátedra de Química Orgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima. 1983.
34. BONILLA P. “Extracción, Identificación de Sapogeninas Esteroidales de *Solanun mammosun*”. Foll. Cátedra de Química Orgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima; 1986.
35. CARLSON J, DOUGLAS G. “Antibacterial Substances Separated from Plants”. Western Reserve University, School of Medicine, Department of Pediatrics. May 1947. Vol 55: 241-248.
36. CHOQUESILLO PF. “Estudio Fitoquímico de *Dioscorea decorticans*”. Foll. Cátedra de Química Orgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima 1984.
37. KANCHANAPOOM T. And YAMASAKI K. “Acetylated Triterpene Saponins from the Thai Medicinal Plant *Sapindus emarginatus*”. Institute of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Medicine, Hiroshima University. September 2001. Vol. 49 N°9: 1195-1197.
38. MAES L, VANDEN BERGHE D. “In Vitro and In Vivo Activities of a Triterpenoid Saponin Extract (PX-6518) from the Plant *Maesa balansae* against Visceral Leishmania Species”. Faculty of Pharmaceutical, Biomedical and Veterinary Sciences, University of Antwerp. Jun 2004. Vol. 48 N°1: 130-136.

39. SANTOS AL, JIMÉNEZ H, CANO A. “Efecto In Vitro de extractos ricos en saponinas sobre el crecimiento de dos bacterias celulolíticas ruminales”. Revista Corpoica. Enero-Junio 2005 Vol. 6 N°1.
40. SUKSAMRARN S, PANSEETA P, KUNCHANAWATTA S, DISTAPORN T, RUKTASING S, SUKSAMRARN A. “Ceanothane- and Lupane-Type Triterpenes with Antiplasmodial and Antimycobacterial Activities from *Ziziphus cambodiana* ” Department of Chemistry, Faculty of Science, Srinakharinwirot University; Sukhumvit, Bangkok. April 2006. Vol. 54 N°4: 535-537.
41. WALLACE R, ARTHAUD L. “Influence of *Yucca shidigera* Extract on Ruminal Ammonia Concentrations and Ruminal Microorganisms”. Rowett Research Institute, Bucksburn. March 1994. Vol. 60 N°6: 1762-1767.
42. OMS. OECD. “Guideline for Testing of Chemical: Acute Oral Toxicity- Acute Toxic Class Method 423”. 2001.
43. GOTTSALL E, LICKFELDT A. “The Occurrence of Antibacterial Substances Active Against *Mycobacterium tuberculosis* in Seed Plants”. Department of Health, Lansing Michigan; p. 920-923.
44. MINAYA LW. “Síntesis de los derivados de la Isoniazida y determinación de su actividad antituberculosa”. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima. 1993.
45. MURPHY M. C., “Plant Products as Antimicrobial Agents”. Department of Microbiology, Miami University. October 1999 Vol. 12 N°4: 564-582.
46. OMS-OPS-CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. “Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la Tuberculosis”. Parte III. Lima 1986; p. 9-22.
47. ROJAS R., BUSTAMANTE B. “Larvicidal, Antimycobacterial and Antifungal Compounds from the Bark of the Peruvian Plant *Swartzia polyphylla* DC”. Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Julio 2006. Vol. 54 N°2: 278-279.

IX. ANEXOS



Figura N°14. Ubicación Geográfica de Paucartambo (colecta de la planta)



Fotografía N°16. Información etnobotánica de la especie en estudio “Choquetacarpo”.



Fotografía N°17. Colecta de la especie en estudio “Choquetacarpo”.



Fotografía N°18. Equipo de Reflujo utilizado para la Obtención de Saponinas-Sapogeninas.



Fotografía N°19. Laboratorio de Farmagonosia Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM.



Fotografía N°20. Hidrolizado, filtrado y evaporado de Saponinas (Sapogeninas).



Fotografía N°21. Preparación de medio de cultivo Lowenstein Jensen (Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°22. Preparación de medio de cultivo Lowenstein Jensen (Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°23. Cabina de Flujo Laminar Vertical
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°24. Material de laboratorio estéril
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°25. Incorporación de la droga al medio de cultivo MLJ.
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°26. Incorporación de la droga al medio de cultivo MLJ.
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°27. Dispensación del medio de cultivo MLJ con droga.
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°28. Dispensación del medio de cultivo MLJ con droga.
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°29. Coagulador de fondo inclinado.
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°30. Medio de cultivo MLJ coagulados.
(Laboratorio de Micobacterias INS).



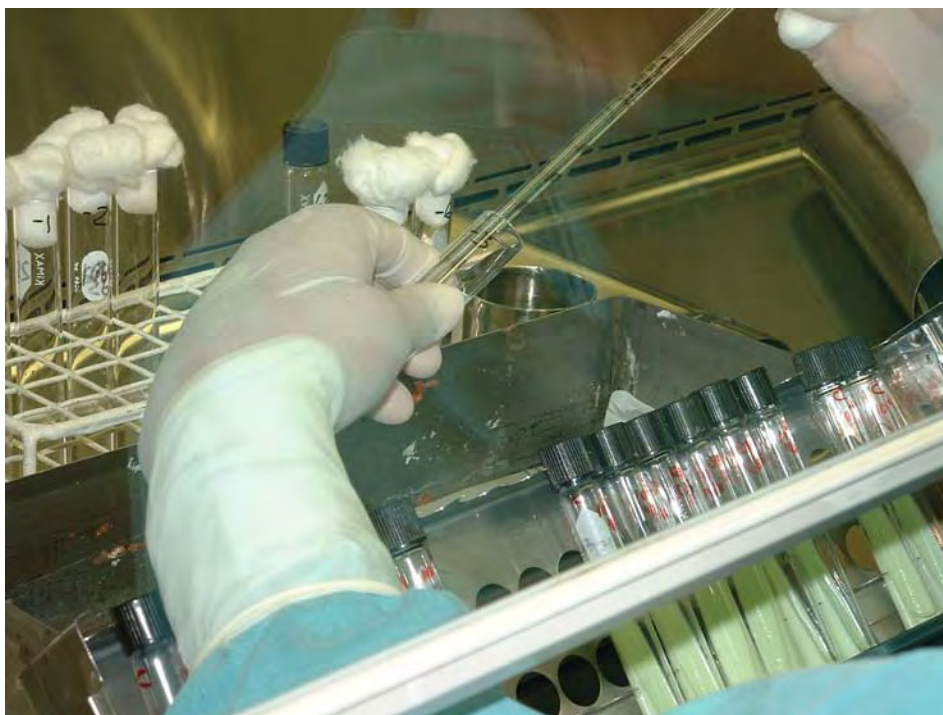
Fotografía N°31. Ceba de *Micobacterium tuberculosis* H₃₇RV.
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°32. Preparación de la suspensión bacilar - diluciones.
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°33. Inoculación en los medios de cultivo MLJ.
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°34. Inoculación en los medios de cultivo MLJ.
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°35. Incubación de los medios de cultivo MLJ.
(Laboratorio de Micobacterias INS).



Fotografía N°36. Lectura de sensibilidad.
(Laboratorio de Micobacterias INS).